

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la policlonalidad de aislamientos clínicos de micobacterias
de crecimiento rápido y caracterización de diferentes factores de
patogenicidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María García Pedrazuela

Directores

Jaime Esteban Moreno
M^a Luisa Gómez-Luz Centelles

Madrid, 2015

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina



ESTUDIO DE LA POLICLONALIDAD DE
AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO
RÁPIDO Y CARACTERIZACIÓN DE
DIFERENTES FACTORES DE
PATOGENICIDAD.

TESIS DOCTORAL

María García Pedrazuela

Directores: Jaime Esteban Moreno y M^a Luisa Gómez-Lus Centelles

Madrid, 2015



D. Jaime Esteban Moreno, Doctor en Medicina y Cirugía, Especialista en Microbiología y Parasitología, Profesor Asociado de la Universidad Autónoma de Madrid, y Dña. María Luisa Gómez-Lus Centelles, Doctora en Medicina, Profesora Titular de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que Dña. MARÍA GARCÍA PEDRAZUELA, Licenciada en Farmacia, Especialista en Microbiología y Parasitología, ha completado bajo su dirección los trabajos conducentes a la obtención de resultados para optar al título de DOCTOR por la Universidad Complutense de Madrid. Y en vista de lo adecuado de su desarrollo, se autoriza la presentación de esta Tesis Doctoral para su evaluación.

Y, para que conste, se firma en Madrid, a 27 de marzo de 2015.

Fdo. Dr. Jaime Esteban Moreno

Fdo. Dra. María Luisa Gómez-Lus Centelles

RELACIÓN DE PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS.

PUBLICACIONES DIRECTAMENTE RELACIONADAS CON LA TESIS

- Concepción Pérez-Jorge, **María García-Pedrazuela**, María-Carmen Muñoz-Egea and Jaime Esteban. Historical evolution of the diseases caused by Non-Pigmented Rapidly Growing Mycobacteria: 1990-2012. Under review.
- **García-Pedrazuela M**, Frutos JM, Muñoz-Egea MC, Alcaide F, Tórtola T, Vitoria A, Cortés P, Esteban J. Polyclonality among clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria: phenotypic and genotypic differences and their potential implications. Clin Microbiol Infect. 2014 Dec 11. pii: S1198-743X(14)00140-2. doi: 10.1016/j.cmi.2014.12.004.
- Esteban J, **García-Pedrazuela M**, Muñoz-Egea MC, Alcaide F. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. Expert Opin Pharmacother. 2012 May; 13 (7):967-86. Review.
- **María García Pedrazuela**, M^a Carmen Muñoz Egea y Jaime Esteban Moreno. Caso de Microbiología Clínica nº 575: “Infección respiratoria por *Mycobacterium abscessus*.” Casos de microbiología clínica de Soria-Melguizo (patrocinado por la SEIMC). 2013 Sept. <http://www.f-soria.es/admfsoria/casos/img/caso%20575.pdf>

OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS CON MICOBACTERIAS

- Muñoz-Egea MC, **García Pedrazuela M**, Mahillo I, Esteban J. Effect of anti-biofilm agents alone and combined with antibiotics on the ultrastructure and development of rapidly growing mycobacteria biofilms. Under review. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2015 Feb.
- Muñoz-Egea MC, **García-Pedrazuela M**, Mahillo I, Esteban J. Effect of ciprofloxacin in the ultrastructure and development of biofilms formed by rapidly growing mycobacteria. Accepted for publication. BMC Microbiology. 2015 Jan.

- Muñoz-Egea MC, **García-Pedrazuela M**, Esteban J. In vitro susceptibility of rapidly growing mycobacteria biofilms against different antimicrobials. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014 Jul 11. pii: S0213-005X(14)00193-1. doi: 10.1016/j.eimc.2014.04.010.
- Muñoz-Egea MC, **García-Pedrazuela M**, Mahillo I, García MJ, Esteban J. Autofluorescence as a tool for structural analysis of biofilms formed by nonpigmented rapidly growing mycobacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Feb;79(3):1065-7. doi: 10.1128/AEM.03149-12. Epub 2012 Nov 30. PMID: 23204419

COMUNICACIONES A CONGRESOS DIRECTAMENTE RELACIONADAS CON LA TESIS

- **García-Pedrazuela M**, Frutos JM, Muñoz-Egea MC, Alcaide F, Tórtola T, Vitoria A, Cortés P, Esteban J. *“Polyclonality of Non-Pigmented Rapidly Growing Mycobacteria (NPRGM): Phenotypic and Genotypic Differences and their Potential Implications.”* Póster en 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Mayo 2014, Barcelona).
- Caldito JM, Muñoz-Egea MC, Frutos JM, **García-Pedrazuela M**, Tórtola T, Vitoria A, Esteban J, Alcaide F. *“Estudio de la policlonalidad en aislamientos clínicos de micobacterias de crecimiento rápido.”* Póster en XVII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Mayo 2013, Zaragoza).

OTRAS COMUNICACIONES RELACIONADAS CON MICOBACTERIAS

- Muñoz-Egea MC, **García-Pedrazuela M**, Esteban J. *“Effect of Ciprofloxacin in the Ultrastructure and development of Biofilms formed by Rapidly Growing Mycobacteria”.* Póster en 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Mayo 2014, Barcelona).
- Muñoz-Egea MC, **García-Pedrazuela M**, Esteban J. *“Estudio de la concentración mínima de erradicación de biopelículas de micobacterias de crecimiento rápido frente a diferentes antimicrobianos”.* Comunicación oral en XVIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Abril 2014, Valencia).
- Muñoz Egea MC, **García Pedrazuela M**, Pérez-Jorge Peremarch C, Esteban J. *“Estudio retrospectivo del uso del QFT en relación con el Mantoux en un Hospital de tercer nivel”.* Póster en XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Mayo 2012, Bilbao).

- **García Pedrazuela M**, Muñoz Egea MC, Esteban J. “*Detección de autofluorescencia en biopelículas de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido.*” Póster en XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Mayo 2012, Bilbao).
- Pérez-Jorge Peremarch C, Muñoz Egea MC, **García Pedrazuela M**, Fouad Salih H, Del Campo Balsa T, Esteban J. “*Evaluación del uso del Quantiferon para el manejo de la infección tuberculosa latente en el Servicio de Salud Laboral en un Hospital Universitario: 2007-2011.*” Póster en XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Mayo 2012, Bilbao).
- **García-Pedrazuela M**, Muñoz-Egea MC, Pérez-Jorge C, Esteban J. “*Evaluation of the use of Quantiferon TB-Gold in the routine setting at a university hospital, 2007-2011*” Póster en 22th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Abril 2012, Londres).
- Muñoz-Egea MC, **García-Pedrazuela M**, García MJ, Esteban J. “*Detection of autofluorescence in biofilms formed by rapidly growing mycobacteria*” Publicación en 22th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Abril 2012, Londres).
- **García Pedrazuela M**, Muñoz Egea MC, Pérez-Jorge Peremarch C, Esteban Moreno J. “*Estudio retrospectivo del uso del QFT en relación con el Mantoux en un Hospital de tercer nivel.*” Comunicación oral en Reunión Anual del Grupo Español de Micobacteriología (Marzo 2012, Córdoba).
- Pérez-Jorge Peremarch C, Muñoz Egea MC, **García Pedrazuela M**, Fouad Salih H, Del Campo Balsa T, Esteban Moreno J. “*Evaluación del uso del Quantiferon para el manejo de la infección tuberculosa latente en el Servicio de Salud Laboral en un Hospital Universitario: 2007-2011.*” Comunicación oral en Reunión Anual del Grupo Español de Micobacteriología (Marzo 2012, Córdoba).
- Muñoz Egea MC, **García Pedrazuela M**, García MJ, Esteban J. “*Detección de autofluorescencia en biopelículas de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido.*” Comunicación oral en Reunión Anual del Grupo Español de Micobacteriología (Marzo 2012, Córdoba).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar las gracias al Dr. Jaime Esteban y a la Dra. M^a Luisa Gómez-Lus, por darme la oportunidad de llevar a cabo esta tesis bajo su dirección. Quiero agradecer especialmente al Dr. Jaime Esteban, el hecho de descubrirme el mundo de la Micobacteriología y de poner en mis manos este proyecto para sacarlo adelante. Gracias por toda la ayuda recibida y por el apoyo y los consejos en los momentos de incertidumbre.

Al Dr. Ricardo Fernández Roblas, que tuve la suerte de tener como tutor durante la residencia, y a los Dres. Ignacio Gadea y Javier Zapardiel, gracias por enseñarme a disfrutar de la que es actualmente mi profesión y por hacerme ver la Microbiología desde diferentes puntos de vista. Todos, junto con el Dr. Jaime Esteban, habéis aportado mucho a mi manera de entender la Microbiología Clínica.

Gracias a Mari, mi Co-R, por su ayuda y participación en esta tesis. Gracias a mis más que compañeros de residencia, Moncho, Cuca, Marta, Iris, Laura y Chela, por todos los momentos de complicidad que hemos vivido dentro y fuera del hospital y sobre todo, gracias por regalarme vuestra amistad. ¡Vosotros también sois parte de esto!

Me gustaría agradecer también la ayuda prestada durante los cuatro años de residencia a todo el personal del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz.

Esta tesis también la han “sufrido” muchas personas fuera de ámbito hospitalario y por ello no quiero perder la oportunidad de decir:

Gracias a mis amigos, a los de siempre, a los de la infancia, a los recientes, a los que viven lejos, a los que viven al lado, a los que veo a menudo, a los que por razones de guión sólo veo en ocasiones especiales, a todos vosotros, que sabéis perfectamente quienes sois,

porque me habéis visto en los buenos momentos pero sobre todo porque me habéis abrazado en los peores. Como dice el refrán, dime con quién andas y te diré quién eres, vuestra amistad me define y me hace especial.

A mis queridísimas farmacéuticas, que me dais la vida cada vez que hacemos “terapia”, por tenernos siempre las unas a las otra para absolutamente cualquier cosa y porque...¡que lo que une la Universidad, que no lo separe el hombre!

Gracias a mi familia por su amor incondicional y sin límites. A mi padre por enseñarme la magia de atesorar conocimientos y a mi madre por ser mi salvavidas y saber cómo mantenerme siempre a flote. Gracias por el hogar con mayúsculas que habéis formado y que ha sido, sin duda, el perfecto caldo de cultivo en el que desarrollar lo mejor de nosotras mismas. A mi hermana porque siempre ha sido y será la niña de mis ojos, el tiempo con ella nunca tendrá precio. Y una mención especial a mi abuelo que me enseñó mucho de la vida real, de lo que significa luchar por tus ideas y nunca rendirte frente a las adversidades. Sus consejos siempre serán un referente.

Gracias a Álvaro, por aparecer en mi vida para quedarse. Tu cariño, comprensión y apoyo a lo largo de todo este tiempo han hecho posible que hoy esté donde estoy. Tú allanas mi camino y sé que juntos llegaremos lejos porque como siempre me has dicho “si lo intentas todo es fácil”.

Los trabajos de investigación recogidos en la presente tesis han sido desarrollados gracias a la financiación recibida por parte del Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del Programa Consolider-Ingenio 2010 (FUNCOAT CSD2008-00023).

A mi familia.

A Álvaro.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 EL GÉNERO <i>Mycobacterium</i> Y LAS MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO.....	3
1.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA.....	5
1.3 EPIDEMIOLOGÍA.....	7
1.4 INFECCIONES PRODUCIDAS POR MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO.....	9
1.5 POLICLONALIDAD.....	12
1.6 SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i> Y TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO...	14
1.7 CAPACIDAD DE PENETRACIÓN INTRACELULAR.....	16
1.8 BIOPELÍCULAS.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
3.1 MICOBACTERIAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO.....	27
<i>Recolección de las cepas clínicas</i>	
<i>Identificación</i>	
<i>Definiciones</i>	
<i>Reaislamiento y subcultivo de los clones</i>	
3.2 SIGNIFICADO DE LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS.....	30
3.3 ESTUDIO GENOTÍPICO DE LA RELACIÓN DE CEPAS MEDIANTE RAPD.....	31
<i>Extracción del ADN</i>	
<i>Cuantificación del ADN extraído</i>	
<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	
<i>Electroforesis</i>	
<i>Análisis fotográfico</i>	

3.4	ESTUDIO DE DIFERENTES FACTORES DE PATOGENICIDAD.....	34
3.4.1	ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE MICRODILUCIÓN EN CALDO.....	34
3.4.2	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS.....	36
	EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	
	DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE LAS COLONIAS	
3.4.3	DETECCIÓN DE GENES DE LAS METILASAS <i>erm</i>	37
	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	
	<i>Electroforesis</i>	
3.4.4	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INVASIVA EMPLEANDO EL MODELO DE MICROCOLONIAS EN FIBROBLASTOS DIPLOIDES HUMANOS.....	38
	<i>Medios empleados</i>	
	<i>Inóculo de micobacterias</i>	
	<i>Modelo de microcolonias de micobacterias en fibroblastos</i>	
3.4.5	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DESARROLLAR BIOPELÍCULAS.....	40
	<i>Técnica utilizada para el desarrollo de biopelículas</i>	
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41

4. RESULTADOS..... 43

4.1	SIGNIFICADO CLÍNICO DE LOS AISLAMIENTOS.....	45
4.2	ESTUDIO GENOTÍPICO DE LOS CLONES DE CADA AISLAMIENTO MEDIANTE RAPD.....	47
4.3	ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO.....	51
4.4	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS.....	56
4.5	DETECCIÓN DE GENES DE LAS METILASAS <i>erm</i>	61

4.6	ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INVASIVA EN EL MODELO DE MICROCOLONIAS EN FIBROBLASTOS HUMANOS COMO FACTOR DE PATOGENICIDAD.....	63
4.7	ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE DESARROLLAR BIOPELÍCULAS COMO FACTOR DE PATOGENICIDAD.....	67
5.	DISCUSIÓN.....	71
5.1	SIGNIFICADO CLÍNICO DE LAS DISTINTAS ESPECIES Y SU RELACIÓN CON LA POLICLONALIDAD.....	73
5.2	EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES POR MCR: FORMA DE ADQUISICIÓN Y LA IMPLICACIÓN DE LA PRESENCIA DE UNO O VARIOS CLONES.....	74
5.3	EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR.....	76
5.4	IMPLICACIONES DEL ESTUDIO.....	78
6.	CONCLUSIONES.....	83
7.	SUMMARY.....	87
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	97
9.	ANEXO.....	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Progresión en el tiempo de una infección pulmonar causada por *M. abscessus* (aislamiento incluido en este estudio).

Figura 2. Foliculitis causada por MCR.

Figura 3. Detalle al microscopio con objetivo de X100 de numerosas micobacterias ubicadas intracitoplásmicamente.

Figura 4. Proceso de formación de una biopelícula.

Figura 5. GenoType® *Mycobacterium* CM/AS.

Figura 6. Distribución de los aislamientos según la especie. **6A:** Distribución total por especies de los 34 aislamientos clínicos. **6B:** Distribución por especies de los aislamientos clínicamente significativos.

Figura 7. Estudio RAPD de la muestra FJD-12 y el dendograma correspondiente para cada cebador.

Figura 8. Estudio RAPD de la muestra FJD-17 y el dendograma correspondiente para cada cebador.

Figura 9. Distribución de aislamientos monoclonales y policlonales según la especie.

Figura 10. Cepa HULP-1, *M. abscessus* morfología rugosa. **10A:** vista macroscópica en placa de Middlebrook 7h10; **10B:** vista al microscopio 10X.

Figura 11. Cepa FJD-16, *M. mucogenicum* morfología lisa. **11A:** vista macroscópica en placa de Middlebrook 7h10; **11B:** vista al microscopio 10X.

Figura 12. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa de la detección del gen *erm* en los aislamientos HCZ-6 y FJD-15.

Figura 13. Aspecto de las microcolonias alargadas en fibroblastos. **13A y 13B:** colonias alargadas de *M. abscessus* cepas FJD-3 y HVH-2 respectivamente. **13C:** colonia alargada de *M. fortuitum*, cepa HCZ-5. **13D:** colonia alargada de *M. mucogenicum*, cepa FJD-16.

Figura 14. Aspecto de las microcolonias redondeadas en fibroblastos. **14A y 14B:** colonias redondeadas de *M. abscessus* cepas HVH-5 y FJD-7 respectivamente. **13C y 13D:** colonias redondeadas de *M. fortuitum* cepas HCZ-3 y FJD-13 respectivamente.

Figura 15. Desarrollo de una biopelícula de *M. fortuitum* (cepa HCZ-3).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios ATS/IDSA para el diagnóstico de enfermedad pulmonar por MNT.

Tabla 2. Relación de cepas incluidas en el estudio.

Tabla 3. Cuadro clínico de los aislamientos significativos.

Tabla 4. Características de los aislamientos que presentaron policlonalidad.

Tabla 5. Valores de sensibilidad *in vitro* expresados en CMI ($\mu\text{g/ml}$) frente a diferentes antimicrobianos de los aislamientos monoclonales.

Tabla 6. Valores de sensibilidad *in vitro* expresados en CMI ($\mu\text{g/ml}$) frente a diferentes antimicrobianos de cada clon identificado dentro de los aislamientos policlonales.

Tabla 7. Características fenotípicas de los aislamientos monoclonales.

Tabla 8. Características fenotípicas de los diferentes clones identificados en los aislamientos policlonales.

Tabla 9. Aislamientos monoclonales con relación largo/ancho $> 1,2$.

Tabla 10. Aislamientos monoclonales: capacidad invasiva y capacidad de desarrollar biopelículas.

Tabla 11. Aislamientos policlonales: capacidad invasiva y capacidad de desarrollar biopelículas.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ATS/IDSA: Sociedad Torácica Americana/ Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (*American Thoracic Society/ Infectious Diseases Society of America*)

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

EMEM: *Eagle's modified Minimal Essential Medium*

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

GLC: Cromatografía de gas-líquido (*Gas-Liquid Chromatography*)

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (*High-Performance Liquid Chromatography*).

MCR: Micobacterias de crecimiento rápido

MNT: Micobacterias no tuberculosas

PBS: Tampon fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PFGE: Electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*)

RAPD: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

TBE: Tampón Tris Borato EDTA

TSS: Agar Triptosa-Soja + 5% sangre de cordero

UFC: Unidades formadoras de colonias

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL GÉNERO *Mycobacterium* Y LAS MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO

Las especies que forman parte del género *Mycobacterium*, definido en 1986 por Lehmann y Neumann (1), poseen características únicas entre otros géneros bacterianos. Este hecho junto con la importancia clínica de las mismas, hacen que las especies de este género se estudien dentro de una subespecialidad específica del campo de la Microbiología, la Micobacteriología. Desde su descripción, que fue realizada para incluir los microorganismos causantes de tuberculosis, en humanos y animales, así como la lepra, hasta la actualidad el número de microorganismos incluidos en este género no ha dejado de crecer. Actualmente hay caracterizadas y descritas 169 especies y 13 subespecies dentro del género *Mycobacterium* (2), pero destaca el hecho de que desde el año 2000 se han descrito 80 nuevas especies, y sólo durante el año 2013 se incorporaron 11 especies a este género (3-10), siendo la última descrita en el momento de redactar esta tesis *M. paragordoniae*, en 2014 (11).

Las diversas especies descritas que no pertenecían al complejo *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* se denominaron como micobacterias ambientales, oportunistas o atípicas. En la actualidad uno de los nombres más aceptados es el de micobacterias no tuberculosas (12-13). En general, las MNT tienen un poder patógeno inferior a *M. tuberculosis*, variable según la especie, sin que exista evidencia científica alguna de transmisión interhumana, salvo casos excepcionales (14-15). Por otra parte, al tratarse de especies ambientales, su aislamiento no siempre tiene significado clínico ya que pueden colonizar cualquier área no estéril del ser humano (16-17). Otro aspecto importante a tener en cuenta a la hora de manejar las infecciones causadas por MNT es el hecho de que suelen mostrar resistencia a los fármacos antituberculosos convencionales aunque algunas

especies, como las de crecimiento rápido, son sensibles a diversos antimicrobianos “convencionales” (18-19).

El amplio número de especies incluidas en este grupo y las diferencias existentes entre ellas llevaron a establecer distintas clasificaciones de las mismas con el objeto de facilitar su estudio. De estas la más ampliamente seguida hasta hace unos años fue la “Clasificación de Ruyon” (20), que divide a las MNT en base a su capacidad de producir pigmentos en presencia o ausencia de luz así como la velocidad de crecimiento *in vitro* en medios de cultivo. Según este esquema, las MNT se distribuían en cuatro grupos de la siguiente manera, el grupo 1 incluye micobacterias fotocromógenas de crecimiento lento, el grupo 2 micobacterias escotocromógenas de crecimiento lento y el grupo 3 micobacterias no cromógenas de crecimiento lento. Por último en el grupo 4, objeto de este estudio, se incluyen las micobacterias de crecimiento rápido, es decir, aquellas que tardan en crecer menos de 7 días en medios de cultivo. Sin embargo, hoy en día esta clasificación está obsoleta, y se prefiere dividir a las micobacterias en dos grandes grupos, crecedores lentos y crecedores rápidos, que presentan diferencias genéticas en base a la presencia de uno o dos operones ribosómicos, respectivamente.

Las MCR pueden sobrevivir en ausencia de nutrientes y en un amplio margen de temperaturas; son capaces de formar biopelículas y son relativamente resistentes a los desinfectantes clorados y al glutaraldehído (21-25). La mayoría de especies incluidas dentro de este grupo son consideradas micobacterias ambientales no patógenas y sólo un pequeño número de especies han demostrado causar infecciones humanas con cierta frecuencia (21, 26).

De todas las especies de MCR recogidas en la literatura, 25 están asociadas al desarrollo de patología infecciosa en humanos (27). Los patógenos más habituales, según recoge la

literatura, son *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*, mientras que el resto se aíslan con menor frecuencia como agentes causantes de enfermedad (28). Sin embargo, todas las MCR son fundamentalmente bacterias ambientales (29-30), como demuestran los múltiples aislamientos a partir de instalaciones de agua y cañerías (31), siendo de especial relevancia, debido a sus implicaciones clínicas, el hecho de que han sido aisladas a partir de soluciones desinfectantes (32-33). Este carácter ambiental de las MCR implica la necesidad de determinar si cada aislamiento es potencialmente significativo o, por el contrario, se trata de un hallazgo casual que puede interpretarse como colonización o contaminación. Actualmente esta decisión se toma en base a criterios internacionalmente aceptados establecidos por la Sociedad Torácica Americana junto con la Sociedad de Enfermedades Infecciosas Americana (13, 34).

1.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

Cuando se trata el tema de la identificación de las especies del género *Mycobacterium* se puede abordar con diferentes metodologías (35), pero siempre teniendo en cuenta que es importante hacer una identificación a nivel de especie, dada la variabilidad en cuanto a significado clínico que existe entre las mismas (36). Durante muchos años, la identificación de estos microorganismos se llevó a cabo mediante métodos fenotípicos, es decir, de acuerdo a las características de las colonias y su comportamiento bioquímico. Se valoraba la velocidad y temperatura de crecimiento, morfología de la colonia, producción de pigmento y, por otro lado, se realizaban pruebas de caracterización tales como la reducción de nitrato, la producción de arilsulfatasa y ureasa, la hidrólisis de Tween 80, el crecimiento en presencia de ClNa al 5% y en agar de MacConkey sin cristal violeta, la reducción del citrato férrico amoniacal y la utilización de manitol, inositol y sorbitol (37). Con el tiempo surgió la

necesidad, por un lado, de diferenciar entre un mayor número de especies, y por otro, de realizar un diagnóstico más precoz. Ambos hechos promovieron el desarrollo de nuevas técnicas más sensibles y específicas que superaron al método tradicional. Sin embargo, a pesar de estas nuevas técnicas, el cultivo y la valoración de las características fenotípicas siguen siendo de importancia en la rutina diagnóstica de laboratorio de Micobacteriología Clínica.

Las técnicas cromatográficas, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gas-líquido (GLC), permiten identificar la mayoría de especies de MCR con interés clínico. Son técnicas rápidas, reproducibles y específicas pero la infraestructura requerida para llevarlas a cabo hace que sean técnicas difícilmente asequibles para la mayoría de los laboratorios convencionales (38). La identificación genotípica es la mejor alternativa a la hora de identificar una amplia gama de especies de MCR. Las técnicas de biología molecular, tanto comerciales como de desarrollo propio, se basan en el reconocimiento de genes específicos o bien determinadas secuencias de ADN. Esto aumenta en gran medida la sensibilidad y además permite identificar microorganismos imposibles de caracterizar por métodos convencionales. Otra gran ventaja es que permite la identificación con independencia de la viabilidad del microorganismo, ya que la información genética microbiana no depende de ello. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se lleva a cabo la amplificación con posterior hibridación, restricción o secuenciación de los productos amplificados de diversas dianas genómicas. Las zonas mejor estudiadas son el gen hsp65, que codifica la proteína micobacteriana de 65KDa (heat sock), las regiones genómicas de la subunidad 16S, un gen bien conservado pero con zonas variables de secuencias de nucleótidos específicas de género y especie, y la región intergénica 16S-23S del ARN ribosómico (26, 35, 39-43). En resumen, cabe destacar que las herramientas moleculares, tales como análisis de la secuencias del 16S rRNA, rpoB y hsp65 o la PCR de análisis de de enzimas de restricción , y la secuenciación de secuencias

alternativas del gen de la superóxido dismutasa (SOD) de genes, *dnaJ*, secuencias intergénicas del 16S-23S rRNA (ITS), *SecA*, *recA1*, *dnaK*, y el gen de la proteína 32-kDa han demostrado resultados prometedores en la detección de especies de MCR (44-45). La PCR de análisis de enzimas de restricción (PRA) funciona mejor que los métodos convencionales en la identificación de las especies que están estrechamente relacionadas. Además recientemente se han introducido otras técnicas como una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas denominada MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo), la pirosecuenciación, la tecnología de chip de ADN, y las sondas Beacon combinadas con sondas de PCR han demostrado resultados comparables en la detección de diversas especies de RGM (46-49)

1.3 EPIDEMIOLOGÍA

El hábitat de las MCR es bastante amplio, habiéndose aislado de suelo y agua, incluyendo los sistemas de abastecimiento (50-53). Existe un amplio abanico de estudios que recogen la presencia de las MCR en estos sistemas, incluyendo muestras relacionadas específicamente con el medio hospitalario, tales como soluciones desinfectantes (54-55). Por lo tanto, este podría ser el origen fundamental de las cepas aisladas en humanos (56).

El estudio epidemiológico molecular de las enfermedades infecciosas tiene por objeto determinar la relación clonal que existe entre varios aislados de una misma especie. Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR se fundamentan en un mismo principio: la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación (57-58). La información obtenida gracias a los extraordinarios avances de las técnicas de biología molecular permite en el caso de brotes epidémicos, por un lado, determinar el número de

clones circulantes, identificar la fuente de contaminación o reservorio así como los vehículos de transmisión y por otro, evaluar la eficacia de las medidas de control dirigidas a evitar la diseminación (59).

Estos avances tecnológicos, con el uso de técnicas como PFGE o RAPD-PCR, han permitido la caracterización molecular de brotes epidémicos de infecciones causadas por estos microorganismos (60-62), permitiendo detectar, en algunos casos, la fuente ambiental de la infección, e incluso detectar pseudoepidemias debidas a la contaminación de medios de cultivo (62-63). Algunos de estos estudios han determinado que, en ausencia de un foco externo, las cepas de distintos pacientes no tienen relación, por lo que la transmisión entre seres humanos podría ser excluida como causa de enfermedad (64-65). A pesar de lo cual, recientemente, nuevos estudios llevados a cabo en pacientes con fibrosis quística sugieren la potencial existencia de transmisión interhumana en algunos casos, posiblemente de forma indirecta (14).

Sin embargo, debido a que las infecciones causadas por MCR no son de declaración obligatoria, su creciente importancia en los últimos años y de su potencial patógeno, no se conoce la incidencia real de estas enfermedades (66). El significado clínico de los aislamientos depende en gran medida de su localización anatómica y del número de muestras en las que se obtienen. Teniendo en cuenta estas premisas, y según las revisiones de casos clínicos recogidas en la literatura, hasta un tercio de los aislamientos se podrían considerar clínicamente significativos (64). Las infecciones por MCR presentan distribución mundial, si bien la mayor parte de los casos publicados pertenecen a países europeos y Estados Unidos (67). Otro dato que habría que tenerse en cuenta es el hecho de que la distribución de las especies parece seguir patrones regionales diferentes (28, 33, 68-69).

1.4 INFECCIONES PRODUCIDAS POR MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO

Desde el punto de vista clínico, las micobacterias implicadas en infecciones se clasifican en 2 grupos: patógenas estrictas, que originan infecciones graves, a veces de curso mortal, con elevada transmisión por el aire y riesgo variable para la comunidad, y patógenas oportunistas, con riesgo individual moderado y de gravedad variable para la comunidad. Las MCR se encuentran en este último grupo, que a su vez se divide en mayores o menores según la incidencia de enfermedad en humanos. Por último habría un tercer grupo, las micobacterias atípicas saprófitas, que incluye aquellas micobacterias que nunca o excepcionalmente han sido descritas como causa de infección (37).

Dentro del amplio grupo que forman las MCR en relación con su patogenicidad cabe destacar como especies oportunistas mayores *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*, siendo responsables de aproximadamente el 90% de las infecciones producidas por MCR (21, 70). Aunque los cuadros clínicos que pueden causar estos microorganismos pueden ser muy variados (71-72), la infección pulmonar es la manifestación más común, en especial en pacientes con patología pulmonar estructural previa (73).

Tabla 1. Criterios ATS/IDSA para el diagnóstico de enfermedad pulmonar por MNT¹ (13).

CRITERIOS CLÍNICOS (ambos requeridos)
1. Síntomas pulmonares, nódulos o cavidades en la radiografía torácica, o bronquiectasias multifocales con múltiples nódulos pequeños en tomografía computarizada de alta resolución.
2. Exclusión apropiada de otros diagnósticos.
CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS
1. Cultivos positivos de al menos 2 muestras de esputo obtenidas por expectoración.
2. Cultivo positivo de al menos un lavado bronquial.
3. Biopsia transbronquial o pulmonar con características histopatológicas micobacterianas (inflamación granulomatosa o tinción ácido-alcohol resistente positiva) y 1 o más muestras de esputo o lavado bronquial con cultivos positivos para MNT.
CONSEJOS
1. Consultar al especialista cuando se aislen MNT en localizaciones infrecuentes o que normalmente representen contaminación ambiental.
2. Los pacientes con sospecha de infección pulmonar por MNT deben ser monitorizados hasta que se establezca o excluya dicho diagnóstico.
3. El diagnóstico de infección pulmonar por MNT no necesita la instauración <i>per se</i> de una terapia ya que es una decisión basada en los riesgos potenciales o beneficios que esta conlleva para un paciente.

M. abscessus es una especie presente en diferentes hábitats acuáticos así como en el suelo.

Esta ubicuidad, unida a su capacidad de sobrevivir en ausencia de nutrientes y en un amplio rango de temperaturas, hace que aparezca en ocasiones como contaminante de suministros

de agua, reactivos, y soluciones de lavado de los hospitales (74). A menudo causa infecciones pulmonares crónicas e infecciones de heridas quirúrgicas, así como infecciones relacionadas con mesoterapia, catéteres, dispositivos de hemodiálisis y cirugía láser, endocarditis, otitis media crónica e infección diseminada en pacientes inmunodeprimidos (75-82). Actualmente es un patógeno emergente en pacientes con fibrosis quística (83-84).



Figura 1. Progresión en el tiempo de una infección pulmonar causada por *M. abscessus* (aislamiento incluido en este estudio).

M. chelonae es una de las especies más frecuentemente aisladas a partir de muestras de pacientes inmunocomprometidos y suele presentar una mayor resistencia a antibióticos. A pesar de que la infección cutánea es el cuadro clínico más habitual, que en determinados estados de inmunosupresión puede llevar a una infección diseminada, es responsable también de infecciones traumáticas localizadas (celulitis, abscesos y osteomielitis) y, en menor proporción, infecciones relacionadas con heridas quirúrgicas y catéteres intravasculares (77, 85-88).

M. fortuitum se ha descrito como responsable de infecciones de heridas, abscesos producidos por inyección, infecciones tras cirugía plástica, osteomielitis traumática, celulitis,

mastitis, peritonitis e infecciones relacionadas con catéteres intravenosos. Las infecciones pulmonares y diseminadas son poco frecuentes (78, 89-93).

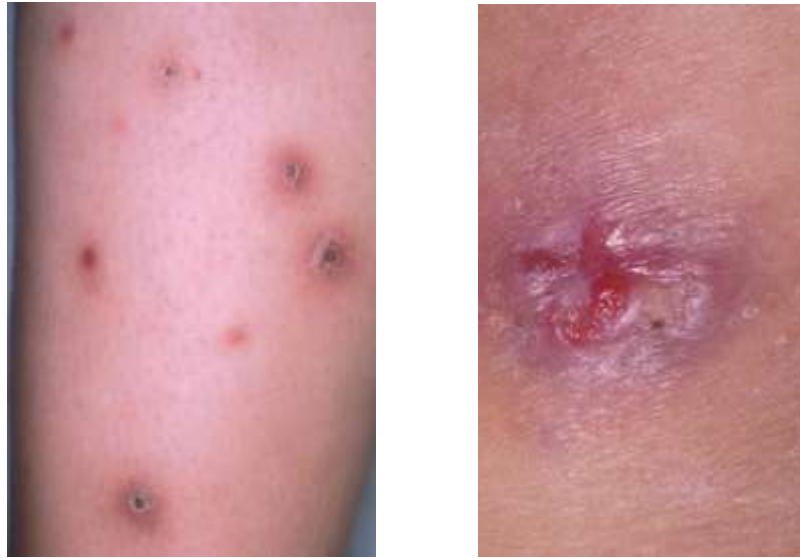


Figura 2. Foliculitis causada por MCR

1.5 POLICLONALIDAD

La policlonalidad se define como la aparición de diferentes genotipos de una misma especie bacteriana (94). Los estudios de laboratorio y los modelos matemáticos sugieren que bajo condiciones de estrés, como puede ser la presencia de antibióticos, se favorece la aparición de cepas mutantes (95).

Las técnicas más ampliamente utilizadas a la hora de determinar diferencias genotípicas entre cepas de una misma especie, establecer el origen de los brotes y agrupar los casos en *clusters*, así como para determinar la posible contaminación de muestras y descartar la

micobacteria como responsable de la patología, son la electroforesis en campo pulsado (PFGE) y la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) (96-99).

La técnica RAPD es una técnica molecular en la que se utilizan uno o varios cebadores con secuencias de nucleótidos aleatorias y de corta longitud (8-12 nucleótidos) que hibridan con regiones inespecíficas del genoma en condiciones de baja astringencia (temperatura de anillamiento a 36-45° y > 2 mM $MgCl_2$), lo que da como producto un ADN heterogéneo pero específico de cada cepa que puede utilizarse como marcador molecular (100). No requiere conocimiento previo de las secuencias diana de ADN y el genoma completo del microorganismo sirve como diana para la comparación entre cepas (101). Este método se puede usar para determinar la heterogeneidad basándose en la diversidad de secuencias de ADN y teniendo en cuenta sus limitaciones (98). Los problemas de reproductibilidad se pueden intentar solventar mediante el análisis de todas las cepas dentro de un mismo gel y realizando todos los experimentos simultáneamente y bajo condiciones rigurosamente estandarizadas. Por otro lado el poder de discriminación de la técnica depende tanto de los cebadores empleados como del número de cebadores empleados (102).

La literatura plantea la hipótesis de que los diferentes genotipos de las micobacterias se corresponderían con sus fenotipos patógenos, y se podría establecer una relación con la progresión de la enfermedad. Es decir, la determinación de los genotipos podría aportar una información valiosa sobre el fenotipo de la enfermedad y su progresión (103).

La presencia de cepas mutantes, puede considerarse como un marcador de riesgo, que habrá que tener en cuenta a la hora de establecer la terapia antimicrobiana (104).

1.6 SENSIBILIDAD *IN VITRO* Y TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO

A la hora de realizar estudios de sensibilidad antimicrobiana de las MCR, con propósitos clínicos, se han valorado todas las técnicas existentes incluyendo la técnica de sensibilidad disco-placa, microdilución en caldo y E-test. Ninguno de estos métodos estuvo bien protocolizado hasta que se publicaron las primeras directrices estandarizadas aprobadas por el CLSI en 2003 (105). Este documento señala como método de referencia la microdilución en caldo y establece puntos de corte para 9 antimicrobianos (amikacina, cefoxitina, claritromicina, doxiciclina, linezolid, imipenem, sulfametoxazol y tobramicina). Posteriormente, el CLSI, estableció además puntos de corte para moxifloxacino, minociclina y cotrimoxazol. La microdilución en caldo por lo tanto se considera el *gold standard* para determinar la sensibilidad de las MCR (106-107), mientras que el resto de métodos tienen problemas de reproductibilidad (108). Así, el uso del E-test no permite conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) exacta para la mayoría de antibióticos (109) y la técnica del disco-placa no es recomendable para estos microorganismos (110). Sin embargo, muchas infecciones causadas por estos microorganismos aún no tienen establecidas pautas de tratamiento consenso ni protocolos para el estudio de sensibilidad claramente protocolizados.

Por otro lado, está demostrada la presencia de mecanismos de resistencia a antimicrobianos en varias especies de MCR (111-112), y debe tenerse en cuenta que la adquisición de genes de resistencia no siempre se detecta con facilidad al realizar el antibiograma. Dentro de estos mecanismos destacan algunos como la producción de metilasas inducibles y la presencia de bombas de eflujo que propician la aparición de resistencia fenotípica a macrólidos y quinolonas respectivamente (113-117). Este hecho es de gran relevancia

clínica, siendo la producción de metilasas el mecanismo de resistencia descrito con mayor repercusión (118-121). Centrándonos en la resistencia a macrólidos, los genes *erm* (*erythromycin ribosome methylation*), de los cuales hay 5 clases descritas, codifican para unas enzimas denominadas metilasas. Estas metilasas son enzimas inducibles cuya actividad consiste en la metilación de los ARN ribosomales 23S, lo que dificulta la unión de los macrólidos a los ribosomas, no pudiendo por ello ejercer su acción (118, 120, 122-123). El hecho de que sean enzimas inducibles implica que su efecto sobre el fenotipo de resistencia antimicrobiana podría no detectarse en las pruebas de sensibilidad estándar (120). El CLSI, considera la posibilidad de detectar la presencia de estos genes una vez realizado el método de sensibilidad por microdilución en caldo realizando una primera lectura de la CMI al tercer día y posteriormente repetir dicha lectura trascurridos 14 días, a menos que el aislamiento sea resistente en la primera lectura (13, 105, 124). Como alternativa, se proponen los métodos moleculares de detección del gen (125).

Una vez establecido el papel actual de las MCR como agentes causantes de infecciones, el tratamiento debe guiarse en función de la especie aislada, la sintomatología, la experiencia clínica y el resultado del estudio de sensibilidad *in vitro*. En este sentido, hay que destacar el hecho de que estas bacterias son resistentes a los fármacos utilizados habitualmente en el tratamiento de la tuberculosis, por lo que se requiere el empleo de otros antibióticos, usados con frecuencia para tratar infecciones causadas por otros microorganismos (126). En este sentido, los estudios *in vitro* realizados han demostrado la relativa estabilidad de los siguientes patrones de sensibilidad: *M. abscessus*, considerada una de las especies más resistentes (84), suele ser sensible a macrólidos, amikacina y cefoxitina y resistente a quinolonas (76, 127); *M. chelonae*, con patrón de sensibilidad muy similar al de *M. abscessus*, es sensible a amikacina y macrólidos y resistente a quinolonas y cefoxitina (128-129), y *M. fortuitum* es sensible a quinolonas pero resistente a macrólidos (18, 125). A pesar de la

estabilidad de estos patrones, la existencia de una gran variabilidad entre cepas hace necesaria la realización de estudios de sensibilidad a aquellos aislamientos considerados como relevantes con el fin de seleccionar la mejor antibioterapia (17).

El tratamiento quirúrgico puede plantearse, en ocasiones, en aquellas infecciones claramente localizadas, con diversos objetivos. La capacidad de estos microorganismos para producir biopelículas hace necesario, en el caso de pacientes portadores de implantes (catéteres, prótesis, mallas y otros), la retirada de dicho biomaterial con el objetivo de eliminar la biopelícula formada por la MCR en el mismo y lograr la curación (130-131). Si la retirada del material no es posible la infección podría volverse intratable a pesar de la sensibilidad *in vitro* de los fármacos utilizados (132-134). Otros objetivos de la cirugía pueden ser la disminución de la carga bacilar o, incluso, la curación en infecciones muy localizadas y de fácil acceso.

1.7 CAPACIDAD DE PENETRACIÓN INTRACELULAR

Es ampliamente conocida la capacidad que presentan los microorganismos del género *Mycobacterium* de invadir células fagocíticas, tales como los macrófagos, especialmente en el caso de *M. tuberculosis* (135). En este sentido, encontramos en la literatura multitud de ensayos realizados tanto en modelos *in vitro* como en modelos animales (136-139). Por otro lado, la capacidad de penetrar y sobrevivir en células no fagocíticas podría reflejar una actividad invasiva mayor, lo que derivaría en una mayor virulencia de la cepa (140-141). Siguiendo esta línea, la evaluación de la morfología de las microcolonias en cultivos celulares puede ayudar a predecir el potencial patológico de distintas especies (142-144).

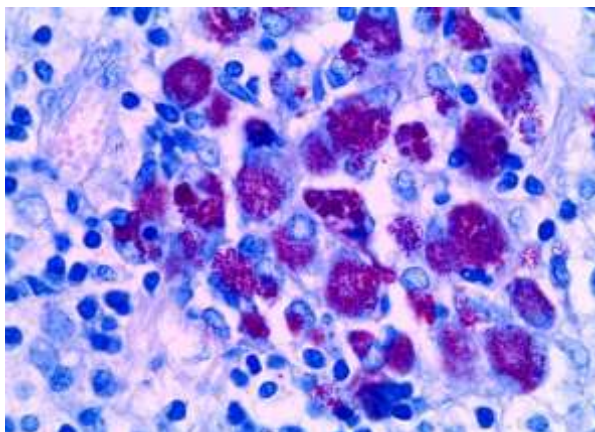


Figura 3. Detalle al microscopio con objetivo de X100 de numerosas micobacterias ubicadas intracitoplásmicamente.

Los primeros ensayos *in vitro* sobre el tema, sugerían que las cepas que eran capaces de invadir los fibroblastos presentaban una morfología de microcolonia alargada y que además se relacionaba con una apariencia de colonia rugosa en el medio de cultivo convencional (142). Sin embargo, estudios posteriores no consiguieron demostrar relación alguna entre estos aspectos fenotípicos entre sí, ni su relación con el significado clínico (144). Actualmente aún están por dilucidar los diferentes determinantes de patogenicidad de las especies englobadas dentro de las MCR así como la relación de los mismos con la capacidad de producir infección.

1.8 BIOPELÍCULAS

La complejidad de la pared celular de las especies del género *Mycobacterium* ejerce un papel importante sobre los factores de patogenicidad de estos microorganismos (145). Entre estos factores destacan la capacidad de desarrollar biopelículas, la capacidad de invasión celular así como de sobrevivir en el interior de las células del huésped y su actividad hemolítica(146-147).

Se sabe que las bacterias crecen en la naturaleza formando biopelículas. J. W. Costerton las definió como comunidades de microorganismos, en muchas ocasiones mixtas, que crecen embebidas en una matriz extracelular, sintetizada por la propia comunidad, y adheridas a una superficie inerte, tejido vivo o interfase (148). Se considera, que bajo las condiciones ambientales adecuadas, cualquier microorganismo es capaz de adherirse y posteriormente desarrollar una biopelícula (149-150). Las biopelículas o biofilms se consideran un importante factor patogénico, convirtiéndose en una fuente de infección persistente y crónica en muchas enfermedades, especialmente aquellas relacionadas con biomateriales (151-153). Estas estructuras poseen su propio sistema de regulación intrínseca denominado *quorum sensing* (154-155). El funcionamiento básico de este mecanismo depende de la acumulación en el medio ambiente de esta molécula señal o inductor como consecuencia de un aumento de la densidad de células presentes (156). En ese momento la molécula interactuaría con receptores en la bacteria que darían lugar a la activación y desactivación de genes.

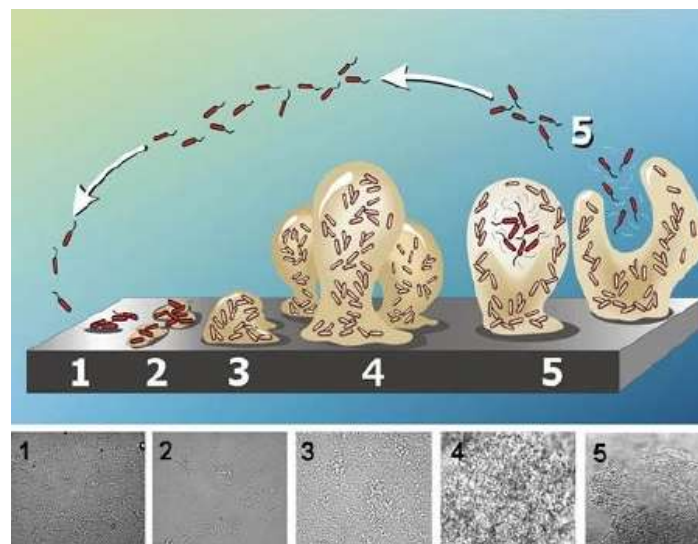


Figura 4. Proceso de formación de una biopelícula.

1 y 2. Adhesión de células en estado planctónico al sustrato y posterior agregación celular en microcolonias; 3 y 4. Crecimiento y maduración de la biopelícula; 5. Propagación de la biopelícula a través del desprendimiento de pequeños o grandes grupos de células. *Center for Biofilm Engineering, Montana State University.*

Se han propuesto cinco etapas en el proceso de formación de la biopelícula, comienza con la fijación de las células planctónicas a la superficie mediante fuerzas débiles, hidrofobicidad o fuerzas de Van der Waals. Tras esto se produce una fuerte adhesión mediante la formación de enlaces covalentes. La tercera y cuarta etapa constituyen una fase de multiplicación y agregación celular, mediante la secreción de exopolímeros que recubren a modo de matriz extracelular, seguida de la maduración de la biopelícula, en la que los microorganismos comienzan a diferenciarse metabólicamente. Por último, en la etapa final, las células que conforman la biopelícula se desprenden y retoman la vida planctónica transitoriamente hasta establecerse en otro punto y comenzar de nuevo el proceso (151, 157-158).

El hecho de que la biopelícula se considere un mecanismo de patogenicidad se debe mayoritariamente a las ventajas, respecto a las bacterias en su estado planctónico, que proporciona esta estructura (159). Una de las más notables es el incremento de la resistencia frente al sistema inmune, así como frente a los agentes antimicrobianos. Dentro de los mecanismos implicados cabe destacar la impermeabilidad frente a diversas sustancias (incluidos antibióticos) debido a la presencia de la matriz extracelular (160), la existencia de microorganismos en estado metabólico latente, frente a las cuales numerosos antimicrobianos son ineficaces (160-161), y la activación de genes de resistencia, inactivos en el estado planctónico, como es el caso de las bombas de eflujo (162-163) y, posiblemente lo más frecuente, la asociación de los mecanismos anteriores. Por otro lado, las bacterias que forman parte de una biopelícula también tienen mayor facilidad para escapar al sistema inmunitario, lo que dificulta su eliminación (164).

La capacidad de formar biopelículas por parte de las MCR está totalmente establecida (165-167). Estudios recientes sugieren que, como cabía esperar, esta capacidad está relacionada con la patogenicidad y la resistencia antimicrobiana de estos microorganismos (18, 168-

170), por lo que su conocimiento cada vez es más relevante de cara a establecer una estrategia óptima de tratamiento de los pacientes con enfermedad causada por MCR.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer la policlonalidad de las micobacterias en un mismo aislamiento mediante el estudio genotípico de los mismos, así como establecer su posible implicación clínica y su influencia sobre distintos factores de patogenicidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la presencia de policlonalidad en aislamientos clínicos de MCR.
2. Estudiar la correlación entre la presencia de policlonalidad, la especie y el significado clínico del aislamiento.
3. Descripción de las características fenotípicas de los clones aislados: morfología de la colonia, velocidad de crecimiento, y su posible relación con la policlonalidad.
4. Estudio de la sensibilidad *in vitro* de los diferentes clones de cada aislamiento a los antimicrobianos más frecuentemente usados para el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos mediante la técnica de referencia microdilución en caldo.
5. Evaluación de la capacidad invasiva de los distintos clones de las micobacterias aisladas mediante el estudio de la morfología de las microcolonias en cultivo de monocapa de fibroblastos humanos.
6. Evaluación de la capacidad de desarrollar biopelículas por parte de los diferentes clones.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MICOBACTERIAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO

Recolección de cepas clínicas

La experimentación se realizó con aislamientos clínicos, tanto de origen respiratorio como extrarrespiratorio, procedentes de pacientes estudiados en la Fundación Jiménez Díaz. Además se añadieron cepas de aislamientos clínicos procedentes de pacientes estudiados en otros hospitales que fueron enviadas al laboratorio de Micobacteriología de la Fundación Jiménez Díaz como parte de un estudio multicéntrico. Dichos hospitales fueron: Hospital Vall d'Hebron (Barcelona), Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza), Hospital Universitario de la Princesa (Madrid) y Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla). El número total de muestras incluidas en el estudio, fue de 34 (Tabla 3).

Las muestras clínicas se procesaron de acuerdo a los protocolos internacionalmente aceptados para el cultivo de micobacterias (100).

Identificación

La identificación a nivel de especie se llevó a cabo utilizando el kit comercial GenoType[®] Mycobacterium AS (Hain Lifescience GmbH, Alemania). El procedimiento completo incluye tres pasos: el aislamiento de ADN procedente de un cultivo, una amplificación múltiple con cebadores marcados con biotina, y por último, una hibridación reversa que consiste en la desnaturalización química del producto a amplificar, la hibridación de amplicones en una sola cadena, marcados con biotina, a sondas unidas a una membrana, lavado astringente y adición de un conjugado de fosfatasa alcalina/streptavidina (AP), y una reacción de tinción mediada por AP. Finalmente se lleva a cabo una interpretación sencilla

y rápida del esquema de bandas obtenido de acuerdo con un patrón suministrado por el fabricante.

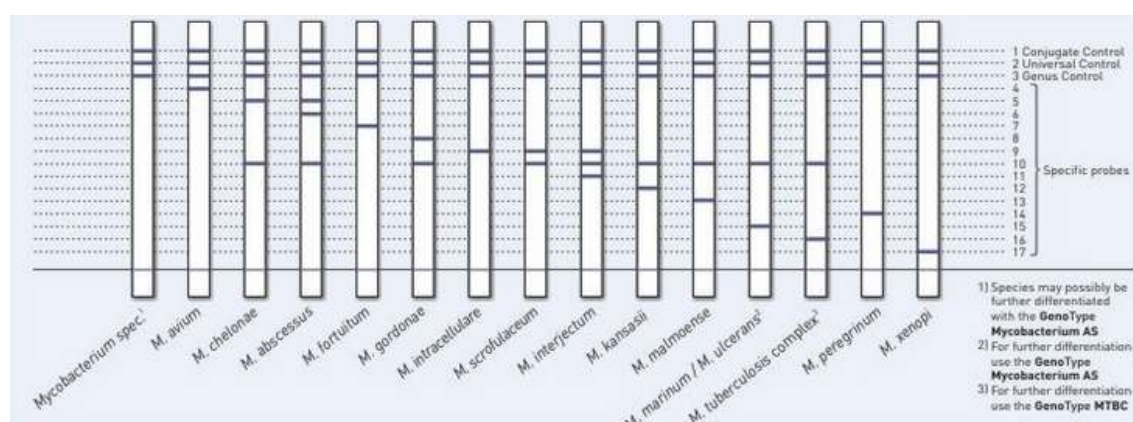


Figura 5. GenoType® Mycobacterium CM/AS.

Fueron estudiados 34 aislamientos clínicos.

Tabla 2. Relación de cepas incluidas en el estudio.

CEPA	ESPECIE	ORIGEN	CEPA	ESPECIE	ORIGEN
FJD-1	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio	HVH-1	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio
FJD-2	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio	HVH-2	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio
FJD-3	<i>M.abscessus</i>	Biopsia ganglio	HVH-3	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio
FJD-4	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio	HVH-4	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio
FJD-5	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio	HVH-5	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio
FJD-6	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio	HVH-6	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio
FJD-7	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio	HVH-7	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio
FJD-8	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio	HVH-8	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio
FJD-9	<i>M.chelonae</i>	Absceso conjuntival	HVH-9	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio
FJD-10	<i>M.fortuitum</i>	Exudado piel	HCZ-1	<i>M.chelonae</i>	Biopsia piel

FJD-11	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio	HCZ-2	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio
FJD-12	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio	HCZ-3	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio
FJD-13	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio	HCZ-4	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio
FJD-14	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio	HCZ-5	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio
FJD-15	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio	HCZ-6	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio
FJD-16	<i>M.mucogenicum</i>	Respiratorio	HULP-1	<i>M. abscessus</i>	Respiratorio
FJD-17	<i>M.mucogenicum</i>	Respiratorio	HUVM-1	<i>M. abscessus</i>	Líquido articular

FJD: cepas procedentes de la Fundación Jiménez Díaz.

HVH: cepas procedentes del Hospital Vall d'Hebron.

HCZ: cepas procedentes del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

HULP: cepas procedentes del Hospital Universitario de la Princesa.

HUVM: cepas procedentes del Hospital Universitario Virgen Macarena.

Definiciones

En este apartado se establecen las definiciones de varios conceptos que se utilizarán a lo largo de este estudio basándose en las definiciones dadas en el tratado “*Molecular Epidemiology of Infectious Diseases*” (171).

Aislamiento: población de células microbianas aisladas en cultivo puro e identificadas a nivel de especie.

Cepa: aislamiento o grupo de aislamientos que muestran características fenotípicas y/o genotípicas que les hacen pertenecer al mismo linaje, y distintas de otros aislamientos de la misma especie.

Clon: aislamiento o grupo de aislamiento que descienden de una cepa precursora común por reproducción no sexual y que presentan rasgos fenotípicos o genotípicos caracterizados por un método de caracterización y que pertenecen al mismo grupo.

Reaislamiento y subcultivo de los clones

Una vez identificado el aislamiento como alguna de las especies pertenecientes al grupo de MCR, se seleccionaron de forma aleatoria 20 colonias del cultivo original y se subcultivaron en placas de Middlebrook 7H10 (BD, Estados Unidos). Una vez crecidas, las colonias de cada aislamiento se mantuvieron congeladas a -20°C en viales de leche desnatada estéril (Oxoid, Reino Unido) hasta que se realizaron los diferentes estudios, y un segundo vial se conservó a -80°C . Antes de cada estudio, se obtuvieron cultivos axénicos de cada bacteria.

3.2 SIGNIFICADO DE LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS

A la hora de establecer el significado clínico de cada aislamiento se tuvieron en cuenta diversos criterios aceptados internacionalmente. Así pues en el documento oficial publicado por la Sociedad Torácica Americana, se establecen los criterios clínicos y microbiológicos para el diagnóstico de enfermedad pulmonar causada por MNT (13). Además todas las historias clínicas fueron revisadas para valorar el carácter significativo de cada aislamiento (13), para lo cual se siguieron los siguientes criterios:

1. Interpretación del aislamiento por parte del clínico que estudió cada paciente, incluyendo el establecimiento de tratamiento específico para el síndrome causado por la infección micobacteriana.
2. Aislamiento de la micobacteria en muestras repetidas del mismo paciente obtenidas en días distintos.
3. Evolución clínica del enfermo en función del tratamiento pautado.
4. Cuadro histopatológico compatible con infección por micobacterias incluyendo la visualización de los bacilos en tinciones ácido-alcohol resistentes.
5. Ausencia de otro patógeno que pudiera ser el agente etiológico más probable de la infección.
6. Cuadro clínico compatible con los descritos en la infección por MCR.

Estos criterios fueron seguidos en la revisión de las historias clínicas de los pacientes estudiados en la Fundación Jiménez Díaz, el resto de hospitales aportaron junto con el cultivo de la muestra clínica el dato del significado clínico de cada aislamiento siguiendo los mismos criterios expuestos con anterioridad.

3.3 ESTUDIO GENOTÍPICO DE LOS AISLAMIENTOS MEDIANTE RAPD

El estudio genotípico mediante la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) se realizó a todas las colonias reaisladas de la muestra original. Todas estas colonias se analizaron de manera que en un mismo gel y experimento coexistieran las 20 colonias pertenecientes a la misma muestra.

Extracción del ADN

Partiendo de un cultivo fresco, se inoculó un asa de cultivo de micobacteria en 500µl de agua estéril libre de ADN. Después se la suspensión se calentó a 95° C durante 30 minutos en el termobloque. A continuación, se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante con el ADN se recogió y se congeló, por duplicado, a -20° C hasta su estudio.

Cuantificación del ADN extraído

Mediante la utilización de un equipo de espectroscopía (Nannodrop®, Thermo Scientific), se determinó la concentración de ADN (ng/microl) presente en cada muestra. Una vez conocidas las concentraciones se ajustaron a 500 µl. El ADN extraído, y diluido se conservó a -20° C.

Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR se realizó utilizando el protocolo descrito por Zhang *et al.* (172), y tres de los cebadores descritos en él. Los cebadores utilizados y sus secuencias fueron:

CEBADORES	SECUENCIA
INS-2	5'- GCGTAGGCGTCGGTGACAAA -3'
IS986-FP	5'- ACGCTCAACGCCAGAGACCA -3'
OPA-2	5'- TGCCGAGCTG -3'

La mezcla de reacción se realizó para un volumen final de 25 µL en los tubos comerciales PureTaq® Ready-To-Go® PCR beads (GE Healthcare, Reino Unido), con una

concentración final de $MgCl_2$ de 1,5 mM. Se añadieron 23 μL de mezcla de reacción y 2 μL de ADN por tubo.

El protocolo de amplificación, utilizado en el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, St Bruno, QC, Canada), fue: 40 ciclos a 94° C durante 1 minuto, 36° C durante 1 minuto y 72° C durante 2 minutos.

Electroforesis

Los fragmentos de ADN amplificado, producto de la de la PCR, fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% (Pronadisa, España), tampón TBE diluido a 1:10 (BioRad, EEUU) y bromuro de etidio. A cada muestra se le añadieron 5 μL de buffer de carga con azul de lactofenol. La electroforesis se llevo a cabo en unas cubetas (Sub-Cell GT o Wide minisub cell GT, de BioRad, Estados Unidos) aproximadamente a cien voltios (suministrador de voltaje Power Pac Basic o Power Pac 300 de BioRad, Estados Unidos). El análisis se realizó en un transiluminador (EcoGen, Estados Unidos) acoplado a un ordenador (EcoGen, National Electronics M900X, Estados Unidos), con PhotoCapt software (BioGene, Estados Unidos), obteniéndose fotografías de los geles. Todas las muestras de el ADN extraído de las colonias que originariamente pertenecían al mismo aislamiento, fueron analizadas en un único gel para poder ser comparado entre si y así detectar la presencia o no de diferentes clones y evitar problemas de reproducibilidad.

Análisis fotográfico

Las fotografías de aquellos geles en los que se observaba una diferencia de más de dos bandas entre los clones, fueron analizadas mediante el programa Bioprofile BioGene Software (Vilber-Lourmat, Marne la Vallée, France). Se obtuvieron dendogramas, de las 20 colonias de cada aislamiento para cada uno de los tres cebadores, con un coeficiente de

homología del 95% y así se determinó el número de clones existentes dentro de cada aislamiento. Se consideró la presencia de monoclonalidad cuando las cepas presentaban una diferencia de 1 o ninguna banda de intensidad moderada o alta con los 3 juegos de cebadores.

3.4 ESTUDIO DE DIFERENTES FACTORES DE PATOGENICIDAD

Los estudios de los factores de patogenicidad se llevaron a cabo con un clon de los aislamientos que habían demostrado ser monoclonales mediante la técnica de RAPD y con un clon de cada población diferenciada por la técnica de RAPD en un mismo aislamiento en los aislados policlonales.

3.4.1. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE MICRODILUCIÓN EN CALDO

La CMI de los diferentes clones fue estudiada mediante la técnica estandarizada para MCR de microdilución en caldo en microplacas estériles de 96 pocillos y los rangos de antibióticos utilizados fueron los sugeridos por el CLSI (105). Cada placa además contenía dos pocillos para el control de crecimiento y dos pocillos para control de esterilidad del medio.

Los antibióticos testados fueron: amikacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina (Sigma, Alemania), y linezolid (Pfizer, Estados Unidos).

En el siguiente cuadro se muestran las concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) testadas para cada antibiótico:

AMIKACINA	1	2	4	8	16	32	64	128			
CEFOXITINA	2	4	8	16	32	64	128	256			
CIPROFLOXACINO	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16			
CLARITROMICINA	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
DOXICICLINA	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32			
LINEZOLID	2	4	8	16	32	64					

Inicialmente las micobacterias se cultivaron en agar TSS (bioMérieux, Francia) y se incubaron a 37°C en atmósfera con suplemento de CO₂. Posteriormente se preparó el inóculo bacteriano directamente de las placas en caldo Müller-Hinton suplementado con cationes (Difco, Detroit, MI) hasta obtenerse una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de McFarland. Así mismo se prepararon diluciones dobles de los antibióticos en caldo Müller-Hinton suplementado con cationes (Difco, Detroit, MI) y se añadieron a los pocillos en los rangos señalados anteriormente para cada antibiótico. El volumen final de cada pocillo fue de 0,1 ml. Cada placa se inoculó con 10 μl /pocillo, quedando una concentración final de 10⁴ UFC/pocillo. Las placas se incubaron a 30°C durante un mínimo de 3 días y un máximo de 5 días. Transcurrido el tiempo se realizó la lectura de la CMI para cada antibiótico.

Se realizaron controles de calidad de las placas de antibióticos, con las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Mycobacterium peregrinum* ATCC 700686, como sugiere el protocolo del CLSI.

Los puntos de corte ($\mu\text{g/ml}$) descritos para las MCR son los siguientes:

ANTIBIOTICO	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
AMIKACINA	≤ 16	32	≥ 64
CEFOXITINA	≤ 16	32-64	≥ 128
CIPROFLOXACINO	≤ 1	2	≥ 4
CLARITROMICINA	≤ 2	4	≥ 8
DOXICICLINA	≤ 1	2-4	≥ 8
LINEZOLID	≤ 8	16	≥ 32

3.4.2. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

Se realizó una suspensión de cada cepa de micobacteria en PBS estéril (Sigma, Estados Unidos), hasta obtener una concentración equivalente a un 0,5 McFarland. Se sembraron 10 μl de esta suspensión utilizando un asa de siembra calibrada en placas de Middlebrook 7H10 (BD, Estados Unidos). Estas placas fueron incubadas en atmósfera normal a 30 °C durante una semana. Se revisó el crecimiento de cada clon diariamente y se consideró la detección de colonias de 1mm de diámetro como el límite para la evaluación de la velocidad de crecimiento, expresado en número de días, para cada cepa.

DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO MORFOLÓGICO DE LAS COLONIAS

Utilizando las mismas placas en las que se determinó la velocidad de crecimiento se observó la morfología de la colonia para su posterior descripción. Las placas de Middlebrook 7H10 (BD, Estados Unidos) de cada clon se observaron tanto a simple vista como con el objetivo 10X en el microscopio óptico. Así se determinó el fenotipo liso o rugoso de cada clon tanto macroscópica como microscópicamente.

3.4.3. DETECCIÓN DE GENES DE LAS METILASAS *erm*

El ADN utilizado fue el mismo que se extrajo para realizar la técnica de RAPD y que se encontraba congelado a -20° C.

Reacción en cadena de la polimerasa

Se utilizaron los cebadores consenso descritos por Nash *et al* (120) para la familia de genes *erm*.

CEBADORES	SECUENCIA
CME-1Y	5'- ACGTGGTGGTGGGCAAYCTG -3'
CME-2	5'- AATTCGAACCACGGCCACCACT -3'

Una vez más la mezcla de la reacción se realizó en los tubos comerciales PureTaq® Ready-To-Go® PCR beads (GE Healthcare, Reino Unido), de manera que la concentración final de MgCl₂ fue de 1,5 mM y el volumen final de 25 µl, para lo cual se añadieron 2µl del ADN a analizar en cada tubo.

El protocolo de la PCR (120) incluía los siguientes pasos: 94° C durante 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 60° C durante 30 segundos y 72° C durante 30 segundos, seguido de 5 minutos a 72° C.

Electroforesis

La electroforesis del gel se llevo a cabo siguiendo el mismo protocolo que el descrito en el apartado “Estudio genotípico de la relación de cepas mediante RAPD”. En resumen, la electroforesis se llevo a cabo en un gel de agarosa al 3%. Se utilizó tampón TBE y un

voltaje de cien voltios. El producto de amplificación se reveló en el transiluminador con bromuro de etido. Se utilizó como control de peso molecular un marcador de 10 bandas (100 bp *DNA ladder*, BioRad, Estados Unidos).

El producto de amplificación del gen *erm* es de 175pb. Las imágenes obtenidas de todos los clones fueron analizadas mediante el Bioprofile BioGene Software (Vilber-Lourmat, Marne la Vallée, France) y se comprobó la presencia o no de la banda correspondiente al gen así como su equivalencia en pares de bases para poder determinar la presencia de dicho gen en los aislamientos.

3.4.4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INVASIVA EMPLEANDO EL MODELO DE MICROCOLONIAS EN FIBROBLASTOS DIPLOIDES HUMANOS

Medios empleados

- Suero: se obtuvo suero de pacientes sin enfermedad/infección tuberculosa. El suero fue separado, mezclado y congelado a -20°C hasta la realización de los experimentos.
- Middlebrook 7H11 (BD, Estados Unidos)
- “Iscove’s modified Dulbecco’s medium” (Sigma, Estados Unidos).
- “Eagle’s modified Minimal Essential Medium” (Sigma, Estados Unidos).

Inóculo de micobacterias

Se cultivaron las cepas de micobacterias en agar Middlebrook 7H11 a 30°C durante 7 días.

Las bacterias fueron entonces suspendidas en medio Iscove-Suero humano (50%) mediante torundas. Posteriormente fueron disgregadas mediante agitación con vortex con perlas de vidrio estériles durante 30 segundos y posteriormente fueron preopsonizadas mediante incubación a 37°C durante 30 minutos. La suspensión de bacterias fue entonces sonicada a baja potencia (sonicador Bandelin Sonorex TK 52, Bandelin electronic, Alemania) durante 5 minutos. Tras 15 minutos de sedimentación a temperatura ambiente, se diluyeron las distintas suspensiones en PBS estéril hasta obtener una suspensión de una turbidez equivalente al 0,5 en la escala de turbidez de McFarland.

Se realizaron posteriormente diluciones 1:10000 a partir de la dilución original con turbidez 0,5 McFarland en medio EMEM.

Modelo de microcolonias de micobacterias en fibroblastos

Se empleó la técnica previamente descrita de estudio de microcolonias de micobacterias en fibroblastos (143) con algunas modificaciones mínimas, siguiendo el protocolo establecido posteriormente por Esteban *et al.* (144).

Las monocapas de fibroblastos se prepararon en placas de 6 x 4 pocillos de la forma previamente descrita (142). Cuando las monocapas de fibroblastos se hicieron confluentes (a los 7 días), los pocillos fueron lavados tres veces con medio de Iscove, y se volvió a añadir este medio para un periodo de equilibrado de 24 horas. Tras este periodo, los pocillos fueron inoculados con la concentración de micobacterias 10^4 UFC de cada clon por pocillo. Las placas fueron incubadas entonces a 37°C en atmósfera de 5% CO₂/95% aire durante 1 hora, y posteriormente fueron lavadas tres veces con medio de Iscove a 37°C. Posteriormente, se añadió en cada pocillo una capa de 1 ml de EMEM a una temperatura de 50-52°C. Una vez que la capa se solidificó a temperatura ambiente, las placas fueron incubadas en una estufa a 37°C en atmósfera de 5% CO₂/95% aire con

humedad. Las microcolonias fueron inspeccionadas diariamente para evaluar la morfología de las mismas y valorar posibles contaminaciones hasta cumplir 4 días de incubación.

En ese momento se tomaron varias fotografías de cada clon (Digital Camera Coolpix 8400, Nikon, Japón), colocando la placa en un microscopio invertido (modelo Leite DM IL Leica, Alemania) con objetivo de 10X, en los pocillos en los que las microcolonias estaban suficientemente separadas unas de otras para poder efectuar posteriormente mediciones sin problemas.

Los diámetros máximo y mínimo de cada colonia, siendo la unidad de medida el pixel (px), fueron medidos mediante el programa ImageJ Launcher software (National Institute of Health, Estados Unidos.). La relación entre el máximo y el mínimo diámetro fue calculada para cada clon.

3.4.5. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DESARROLLAR BIOPELÍCULAS

Técnica utilizada para el desarrollo de biopelículas

Este experimento, basado en el protocolo descrito en el artículo de *Esteban et al.* (165), se desarrolló utilizando microplacas de 96 pocillos con fondo plano. El inóculo utilizado se obtuvo sembrando los diferentes clones de micobacterias en caldo Middlebrook 7H9 (BD, Estados Unidos) y dejándolos crecer a 30°C durante cinco días.

Trascurrido este tiempo, estos caldos de cultivo se centrifugaron a 3000 r.p.m. y el sedimento se lavó con PBS estéril (Sigma, Estados Unidos). Este procedimiento se realizó dos veces. A continuación, la suspensión obtenida se ajustó con PBS estéril a un 0,5 en la escala de turbidez de McFarland.

La placa de 96 pocillos se inoculó con 100 μ l de las diferentes soluciones de bacterias ajustadas de manera que cada fila se correspondía con un clon diferente. Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37°C retirándose posteriormente el inóculo con una pipeta Pasteur estéril. Los pocillos se lavaron con PBS estéril añadiendo a continuación 100 μ l de medio Middlebrook 7H9. Las placas se incubaron en un agitador orbital a 80 r.p.m, a temperatura ambiente durante un máximo de 12 días. Se reemplazó el medio de cultivo cada 3 días.

Cada día, una columna de pocillos se lavó con agua destilada estéril y se tiñó con fucsina básica durante 15 minutos. Luego se lavó con agua destilada estéril y se decoloró con etanol absoluto durante 10 segundos. Los restos de etanol se eliminaron con agua y los pocillos se dejaron secar.

Cada día después de la tinción, se tomaron fotografías (Digital Camera Coolpix 8400, Nikon, Japón) de cada uno de los pocillos a bajo aumento (10X) en un microscopio invertido (modelo Leite DM IL Leica, Alemania). Se realizaron entre 3 y 4 fotografías por pocillo al día. Todas las imágenes fueron procesadas y analizadas con el programa ImageJ Launcher software (National Institute of Health, Estados Unidos). Se evaluó la superficie cubierta, considerándose que había llegado al tope de su crecimiento cuando la superficie cubierta alcanzaba el 100%. Este dato, junto con el tiempo de medición, se utilizó para generar la curva de crecimiento de la biopelícula formada por cada clon.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se trata fundamentalmente de un estudio descriptivo en el que se definen diferentes características que posteriormente se intentan relacionar con la variable monoclonalidad/policlonalidad. Dicha comparación de variables se lleva a cabo

sistemáticamente aplicando una prueba de significación estadística utilizada en el análisis de tablas de contingencia: el test exacto de Fisher. Este test permite analizar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña y no se cumplen las condiciones necesarias para que la aplicación del test χ^2 sea adecuada.

4. RESULTADOS

4.1 SIGNIFICADO CLÍNICO DE LOS AISLAMIENTOS

Se aislaron e identificaron un total de 34 aislamientos clínicos de MCR (19 *M. abscessus*, 2 *M. chelonae*, 11 *M. fortuitum* y 2 *M. mucogenicum*), procedentes tanto de la Fundación Jiménez Díaz como del resto de hospitales colaboradores. De éstos, se determinó que 23 (19 *M. abscessus*, 2 *M. chelonae* y 2 *M. fortuitum*) fueron clínicamente significativos de acuerdo con los criterios anteriormente expuestos.

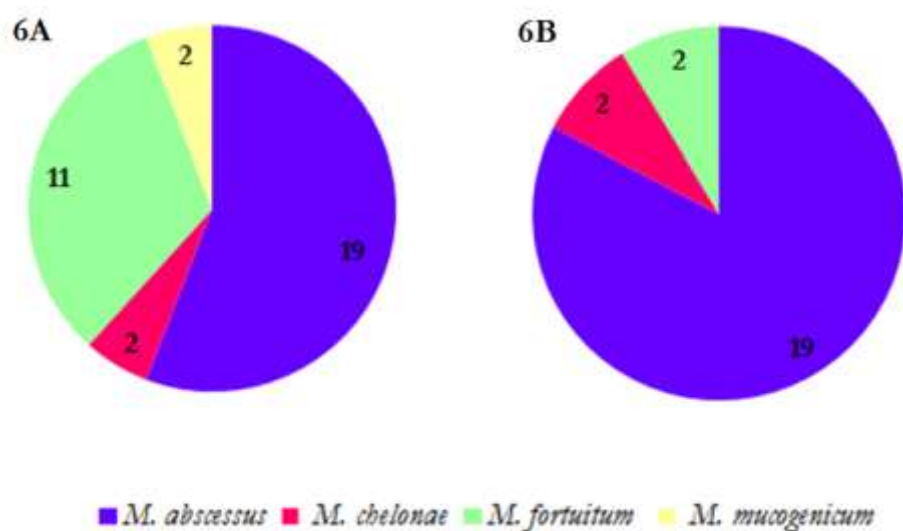


Figura 6. Distribución de los aislamientos según la especie. **6A:** Distribución total por especies de los 34 aislamientos clínicos. **6B:** Distribución por especies de los aislamientos clínicamente significativos.

Tabla 3. Cuadro clínico de los aislamientos significativos.

AISLAMIENTO	ESPECIE	CUADRO CLÍNICO
FJD-1	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
FJD-2	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
FJD-3	<i>M.abscessus</i>	Infección de piel y partes blandas
FJD-4	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
FJD-5	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
FJD-6	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
FJD-7	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
FJD-8	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
FJD-9	<i>M.chelonae</i>	Conjuntivitis
HVH-1	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
HVH-2	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
HVH-3	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
HVH-4	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
HVH-5	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
HVH-6	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
HVH-7	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
HVH-8	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
HVH-9	<i>M.abscessus</i>	Infección respiratoria
HCZ-1	<i>M.chelonae</i>	Infección de piel y partes blandas
HCZ-2	<i>M.fortuitum</i>	Infección respiratoria
HCZ-3	<i>M.fortuitum</i>	Infección respiratoria
HULP-1	<i>M.abscessus</i>	Fibrosis quística
HUVM-1	<i>M.abscessus</i>	Artritis

Cabe destacar el hecho de que *M. abscessus* y *M. chelonae* resultaron ser las especies más patógenas, ya que el 100% de los aislamientos fueron clínicamente significativos. En el caso de *M. abscessus* el 95% de los aislamientos significativos se relacionaron con infección respiratoria, entre los que se encuentra un caso de fibrosis quística. El único aislamiento significativo de *M. abscessus* extrarrespiratorio fue el obtenido a partir de un líquido articular procedente de un paciente con artritis psoriásica y tenosinovitis de muñeca de meses de evolución (HUVM-1). Por otro lado los aislamientos de *M. chelonae* se corresponden con un absceso conjuntival en paciente con tumor miofibroblástico del párpado inferior (FJD-9) y

una biopsia de nódulos con disposición esporotricóide en extremidad izquierda superior en paciente diabético (HCZ-1).

En cuanto a los aislamientos de *M. fortuitum* resultaron ser en su mayoría no significativos a excepción de dos casos de infección respiratoria. Uno de ellos un paciente joven sin enfermedades de base que presentaba una condensación pulmonar en el lóbulo superior derecho (HCZ-2) y por otro lado un paciente con bronquiectasias, EPOC y cardiopatía isquémica crónica (HCZ-3).

Ninguno de los aislamientos de *M. mucogenicum* fue considerado como clínicamente significativo.

4.2 ESTUDIO GENOTÍPICO DE LOS CLONES DE CADA AISLAMIENTO MEDIANTE RAPD

Tras llevar a cabo el estudio genotípico mediante la técnica de RAPD a todas las colonias reaisladas de la muestra original, así como el análisis de homología de los diferentes clones gracias a la obtención de dendrogramas para cada cebador y muestra, se determinó que siete de las treinta y cuatro muestras presentaban más de un clon. A continuación se muestran dos ejemplos de estudio RAPD (fotografía del gel de agarosa) junto con el dendrograma obtenido mediante el análisis con el software Bioprofile BioGene (Vilber-Lourmat, Marne la Vallée, France) de dos de las muestras que resultaron policlonales (Figuras 6 y 7). El criterio establecido para detectar la presencia de más de un clon dentro de un mismo aislamiento fue la diferencia de dos o más bandas de alta densidad en al menos un cebador.

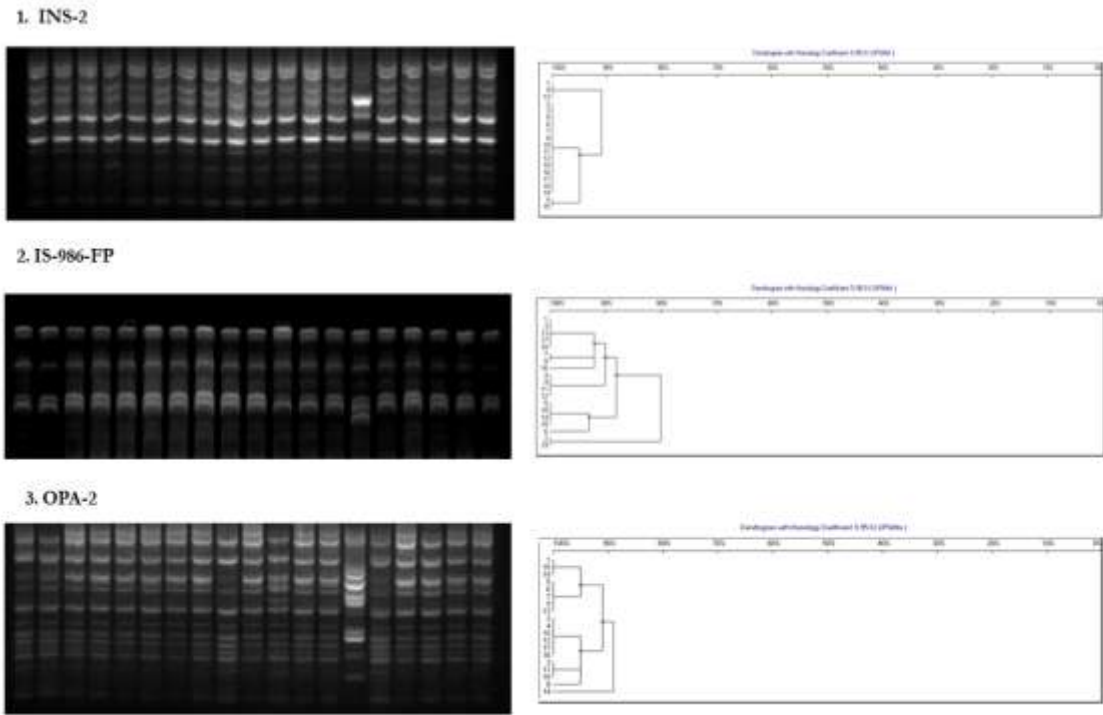


Figura 7. Estudio RAPD de la muestra FJD-12 y el dendrograma correspondiente para cada cebador.

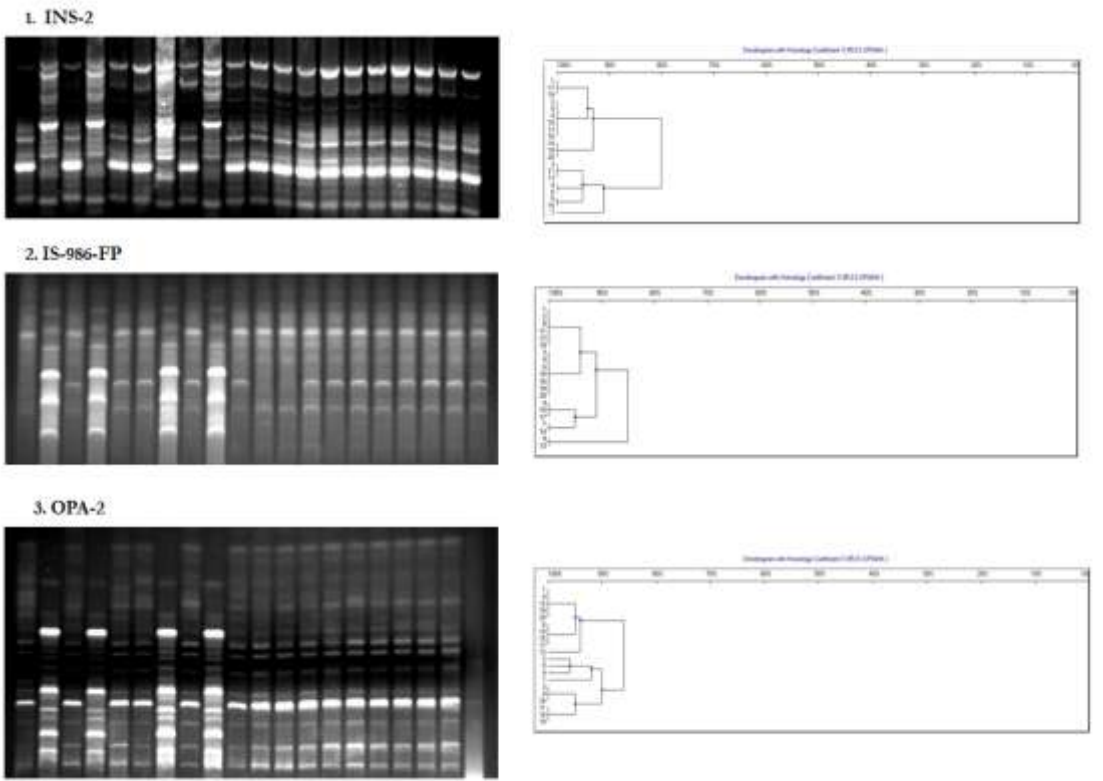


Figura 8. Estudio RAPD de la muestra FJD-17 y el dendrograma correspondiente para cada cebador.

El 79,4% de las muestras del estudio resultaron ser monoclonales (los patrones de las 20 colonias aisladas originariamente para cada muestra no presentan diferencias significativas) mientras que el 20,6% de las muestras presentan policlonalidad. Dentro de las cepas policlonales la distribución por especies fue la siguiente: 1 *M. abscessus*, 5 *M. fortuitum* y 1 *M. mucogenicum*, detectándose un total de 50 clones diferentes. La incidencia de aparición del fenómeno de policlonalidad para cada especie resultó ser del 0 % para *M. chelonae*, 5,26% para *M. abscessus*, 45,45% para *M. fortuitum* y 50% para *M. mucogenicum*.

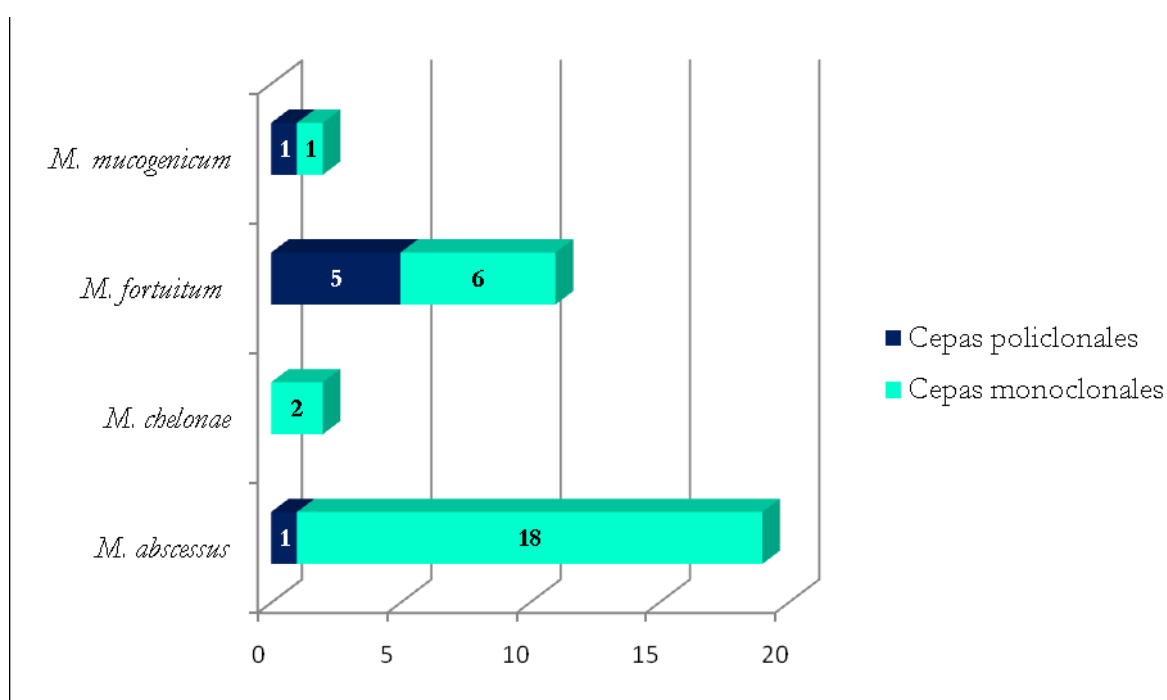


Figura 9. Distribución de aislamientos monoclonales y policlonales según la especie.

Como se puede observar en la tabla 4, todos los aislamientos que presentaron policlonalidad eran de origen respiratorio y sólo uno de ellos, *M. abscessus*, fue clínicamente significativo. El número de clones detectados varía en un rango de entre 11 y 3, lo que equivale a una media de 7,14 clones/aislamiento.

Tabla 4. Características de los aislamientos que presentaron policlonalidad.

 AISLAMIENTO	 ESPECIE	 ORIGEN	 SIGNIFICADO CLÍNICO	 N° CLONES
FJD-12	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio	NO	3
FJD-13	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio	NO	8
FJD-14	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio	NO	8
FJD-15	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio	NO	8
FJD-17	<i>M.mucogenicum</i>	Respiratorio	NO	6
HVH-9	<i>M.abscessus</i>	Respiratorio	SI	6
HCZ-6	<i>M.fortuitum</i>	Respiratorio	NO	11

A la hora de ampliar el análisis de los datos, se agruparon las especies en base a su patogenicidad en humanos como grupo abscessus-chelonae (*M. abscessus* y *M. chelonae*) y grupo fortuitum (*M. fortuitum* y *M. mucogenicum*). Siguiendo esta división en dos grupos, el grupo abscessus-chelonae tuvo una incidencia de policlonalidad del 4,76% mientras que el grupo fortuitum presentó una incidencia del 46,15%. La diferencia de aparición de aislamientos policlonales entre ambos grupos resultó ser estadísticamente significativa ($P=0,007$, Test exacto de Fisher).

Si relacionamos el fenómeno de policlonalidad con el significado clínico de los aislamientos, nos encontramos con que un solo aislamiento policlonal resultó tener significado clínico, mientras que, de los 27 aislamientos en los que sólo se detectó un clon, 22 fueron responsables del cuadro clínico del paciente. Por lo tanto el 95,6% de los casos clínicamente significativos se corresponden con aislamientos monoclonales. Mediante el análisis estadístico a través de la prueba del test exacto de Fisher, se determinó que la diferencia de significado clínico entre los aislamientos mono y policlonales es estadísticamente significativa ($P=0,002$).

4.3 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

La sensibilidad, mediante el método de microdilución en caldo, fue estudiada para cada uno de los 34 aislamientos que forman parte de este estudio. La tabla 5 muestra las CMI de los 6 antimicrobianos ensayados frente a cada uno de los aislamientos monoclonales, mientras que en la tabla 6 se muestra la sensibilidad, a estos mismos agentes, de cada clon que se detectó en aquellos aislamientos que resultaron ser policlonales.

Comenzando con los datos obtenidos en el estudio de sensibilidad de las cepas monoclonales, se observaron los siguientes porcentajes de resistencia: el 11% fueron resistentes a amikacina, el 7,4% a cefoxitina, 25,9% ciprofloxacino, 11% a claritromicina y 77,8% a doxiciclina. No hubo ninguna cepa resistente a linezolid. Además de estas resistencias, un gran número de aislamientos presentaron valores intermedios frente a los antimicrobianos, así pues el 59,3% de las cepas presentaron valores de CMI intermedios para la cefoxitina, el 33,3% para el ciprofloxacino, el 3,7% para la claritromicina, el 7,4% para la doxiciclina y el 11% para el linezolid. Basándonos en estos datos, se puede señalar que la amikacina, claritromicina y linezolid fueron los antimicrobianos más efectivos contra los aislamientos de MCR monoclonales, con los siguientes porcentajes de sensibilidad respectivamente 89%, 85% y 89%.

En cuanto a los siete aislamientos policlonales, se consideró que existía diferencia en la sensibilidad entre los clones cuando la CMI era diferente entre ellos en dos o más diluciones. Siguiendo este criterio, cuatro de los siete aislamientos policlonales mostraron diferencias en su sensibilidad. Las diferencias se detectaron en un incremento de resistencia frente al antibiótico testado en al menos uno de los clones y en un máximo de tres. Una de las cepas, la HCZ-6, fue el único caso en el que todos los clones fueron resistentes para un

antimicrobiano, la doxiciclina, excepto uno de sus clones que resulto ser sensible con una CMI $< 0,25 \mu/\text{ml}$. Estas diferencias aparecieron en todos los agentes estudiados excepto en el caso del linezolid donde todos los clones resultaron ser sensibles. Estudiando los 50 clones como aislamientos en sí mismos el porcentaje de resistencias a amikacina fue del 4%, a ciprofloxacino del 4%, a la claritromicina del 6% y a la doxiciclina del 80%. En el caso de la cefoxitina no se detectaron valores de CMI clasificados como resistentes pero sin embargo el 54% de los clones presentaron una sensibilidad intermedia.

Si comparamos las distribución de sensibilidades entre los aislamientos monoclonales y los policlonales, y a efectos prácticos los datos de sensibilidades intermedias las incluimos dentro de las resistentes, la diferencia de sensibilidad a ciprofloxacino entre ambos grupos resulta ser estadísticamente significativa ($P= 0,039$, Test exacto de Fisher). Por lo tanto el grupo de aislamientos monoclonales presenta una menor sensibilidad frente a ciprofloxacino que el grupo de los aislamientos policlonales y esta diferencia de sensibilidades es significativa.

Tabla 5. Valores de sensibilidad *in vitro* expresados en CMI (µg/ml) frente a diferentes antimicrobianos de los aislamientos monoclonales.

ASLAMIENTO	ESPECIE	AMIKACINA	CEFOXITINA	CIPROFLOXACINO	CLARITROMICINA	DOXICICLINA	LINEZOLID
FJD-1	<i>M.abscessus</i>	<1	16	1	0,25	32	8
FJD-2	<i>M.abscessus</i>	4	32	4	< 0,06	< 0,25	16
FJD-3	<i>M.abscessus</i>	4	64	4	< 0,06	> 32	4
FJD-4	<i>M.abscessus</i>	4	16	2	0,25	> 32	16
FJD-5	<i>M.abscessus</i>	4	64	4	0,125	> 32	4
FJD-6	<i>M.abscessus</i>	4	32	4	<0.06	> 32	16
FJD-7	<i>M.abscessus</i>	4	64	4	< 0.06	> 32	4
FJD-8	<i>M.abscessus</i>	2	8	0,5	< 0,06	32	< 2
HUVM-1	<i>M.abscessus</i>	2	32	2	< 0.0.6	> 32	4
HVH-1	<i>M.abscessus</i>	4	8	2	0,25	16	4
HVH-2	<i>M.abscessus</i>	2	16	2	< 0.06	> 32	8
HVH-3	<i>M.abscessus</i>	2	32	2	< 0.06	> 32	< 2
HVH-4	<i>M.abscessus</i>	<1	4	2	< 0,06	> 32	< 2
HVH-5	<i>M.abscessus</i>	2	32	2	< 0.06	32	8
HVH-6	<i>M.abscessus</i>	> 128	32	2	0,125	1	4
HVH-7	<i>M.abscessus</i>	> 128	32	8	< 0,06	> 32	8
HVH-8	<i>M.abscessus</i>	8	64	4	< 0,06	> 32	4
HULP-1	<i>M.abscessus</i>	> 128	32	0,5	64	4	< 2
FJD-9	<i>M.chelonae</i>	16	> 256	2	< 0.06	> 32	4
HCZ-1	<i>M.chelonae</i>	8	> 256	1	< 0.06	> 32	4
FJD-10	<i>M.fortuitum</i>	< 1	32	< 0.125	4	> 32	< 2
FJD-11	<i>M.fortuitum</i>	16	32	< 0.125	64	32	8
HCZ-2	<i>M.fortuitum</i>	2	16	< 0.125	2	8	<2
HCZ-3	<i>M.fortuitum</i>	4	16	< 0.125	32	4	< 2
HCZ-4	<i>M.fortuitum</i>	< 1	32	< 0.125	2	> 32	< 2
HCZ-5	<i>M.fortuitum</i>	< 1	32	< 0.125	2	< 0.25	< 2
FJD-16	<i>M.mucogenicum</i>	< 1	16	0,25	< 0.06	< 0.25	< 2

*Interpretación de las CMI según puntos de corte descritos por el CLSI: **Sensible**, **Intermedio** y **Resistente**.

Tabla 6. Valores de sensibilidad *in vitro* expresados en CMI ($\mu\text{g/ml}$) frente a diferentes antimicrobianos de cada clon identificado dentro de los aislamientos policlonales.

ASLAMIENTO	CLON	AMIKACINA	CEFOXITINA	CIPROFLOXACINO	CLARITROMICINA	DOXICICLINA	LINEZOLID
HVH-9 <i>M. abscessus</i>	1	> 128	16	32	< 0,06	> 32	< 2
	2	4	16	32	< 0,06	> 32	< 2
	3	8	16	0,5	< 0,06	1	< 2
	4	8	16	0,5	< 0,06	1	< 2
	5	8	16	0,5	< 0,06	1	< 2
	6	> 128	16	1	< 0,06	32	4
FJD-12 <i>M. fortuitum</i>	1	< 1	32	< 0,125	1	> 32	4
	2	< 1	32	< 0,125	2	32	4
	3	< 1	32	< 0,125	2	32	4
FJD-13 <i>M. fortuitum</i>	1	< 1	32	< 0,125	2	8	<2
	2	< 1	32	< 0,125	2	8	<2
	3	< 1	32	< 0,125	2	8	<2
	4	< 1	32	< 0,125	4	8	<2
	5	< 1	32	< 0,125	2	8	<2
	6	< 1	32	< 0,125	4	8	<2
	7	< 1	32	< 0,125	2	8	<2
	8	< 1	32	< 0,125	2	8	<2
FJD-14 <i>M. fortuitum</i>	1	< 1	16	< 0,125	0,5	16	<2
	2	< 1	32	< 0,125	1	16	<2
	3	< 1	16	< 0,125	0,5	8	<2
	4	< 1	16	< 0,125	1	16	<2
	5	< 1	32	< 0,125	0,5	16	<2
	6	< 1	16	< 0,125	0,5	16	<2
	7	< 1	16	< 0,125	1	16	<2
	8	< 1	16	< 0,125	0,5	16	<2

FJD-15	1	< 1	16	< 0,125	8	32	<2
<i>M. fortuitum</i>	2	< 1	16	< 0,125	8	32	<2
	3	< 1	16	< 0,125	8	32	<2
	4	< 1	8	< 0,125	1	32	<2
	5	< 1	16	< 0,125	1	32	<2
	6	< 1	8	< 0,125	1	32	<2
	7	< 1	16	< 0,125	2	32	<2
	8	< 1	16	< 0,125	1	32	<2
HCZ-6	1	< 1	32	< 0,125	2	16	4
<i>M. fortuitum</i>	2	< 1	32	< 0,125	2	16	4
	3	< 1	32	< 0,125	2	16	4
	4	< 1	32	< 0,125	2	16	4
	5	< 1	32	< 0,125	2	16	4
	6	< 1	32	< 0,125	2	16	4
	7	< 1	32	< 0,125	2	16	<2
	8	< 1	32	< 0,125	2	16	4
	9	< 1	32	< 0,125	2	< 0,25	4
	10	< 1	32	< 0,125	2	32	4
	11	< 1	32	< 0,125	2	16	4
FJD-17	1	< 1	8	0,25	< 0,06	< 0,25	< 2
<i>M. mucogenicum</i>	2	< 1	32	< 0,125	0,25	< 0,25	4
	3	< 1	8	0,25	< 0,06	< 0,25	< 2
	4	< 1	32	< 0,125	0,5	< 0,25	4
	5	< 1	32	< 0,125	0,5	< 0,25	4
	6	< 1	8	0,25	< 0,06	< 0,25	< 2

*Interpretación de las CMI según puntos de corte descritos por el CLSI: **Sensible**, **Intermedio** y **Resistente**.

4.4 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

Dentro de las características fenotípicas se estudió, para cada clon, la velocidad de crecimiento, así como la morfología de la colonia para determinar el fenotipo liso o rugoso de las mismas.

Comenzando con el análisis de la velocidad de crecimiento, el grupo de aislamientos monoclonales presentó un resultado de entre 3 y 7 días para las colonias de *M. abscessus* (entre los aislamientos FJD-1 y HLP-1 ambos incluidos) y de entre 4 y 6 días para las colonias de *M. fortuitum* (aislamientos incluidos entre FJD-10 y HCZ-5). Sin embargo, las cepas de *M. chelonae* y *M. mucogenicum* mostraron una velocidad de crecimiento homogénea de 4 días. Por otro lado la velocidad de crecimiento no siguió ningún patrón en cuanto a los diferentes clones pertenecientes a los 7 aislamientos policlonales. En todos los aislamientos policlonales se observó variabilidad en la velocidad de crecimiento entre los distintos clones de un mismo aislamiento, no pudiéndose establecer ninguna relación.

En el segundo estudio para establecer las características fenotípicas, las diferentes colonias se clasificaron en dos grupos lisas o rugosas según la morfología de la colonia tanto a simple vista como microscópicamente.

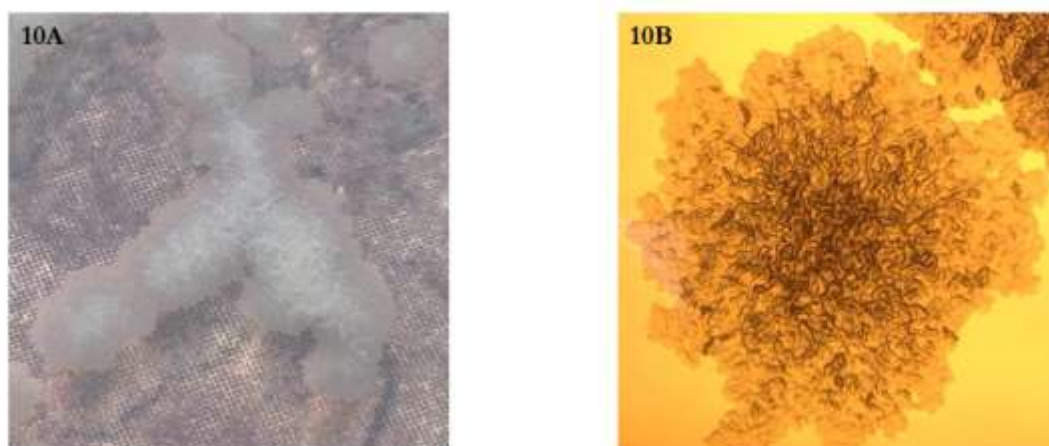


Figura 10. Cepa HULP-1, *M. abscessus* morfología rugosa. **10A:** vista macroscópica en placa de Middlebrook 7H10; **10B:** vista al microscopio 10X.

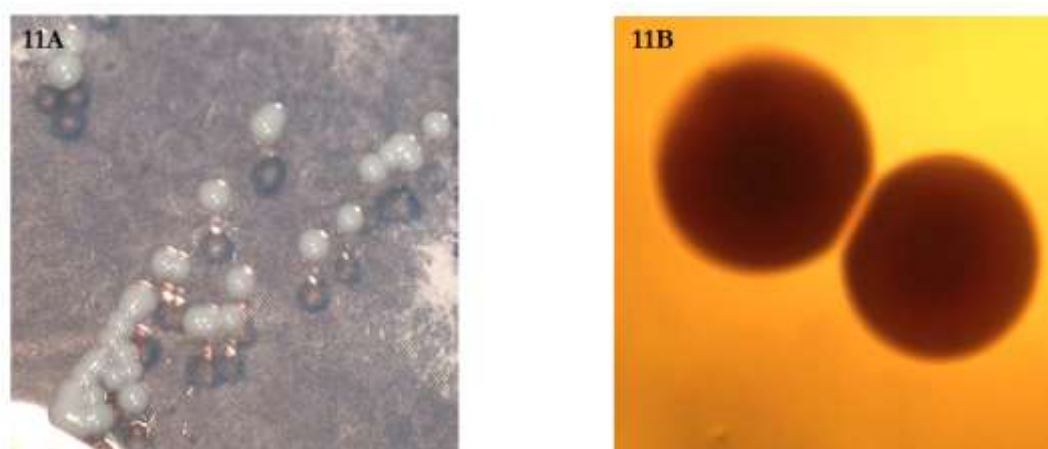


Figura 11. Cepa FJD-16, *M. mucogenicum* morfología rugosa. **11A:** vista macroscópica en placa de Middlebrook 7H10; **11B:** vista al microscopio 10X.

Dentro de los aislamientos monoclonales hubo tres casos en los que la morfología de la colonia a simple vista se clasificó como lisa y sin embargo la visualización con el microscopio determinó que se trataba de cepas rugosas (FJD-1, FJD-9 y HCZ-5). Basándonos únicamente en los datos microscópicos, el 67,6% de los aislamientos presentaron morfología rugosa de los cuales un 61% pertenecía al grupo abscessus-chelonae y un 39% al grupo fortuitum. Un 29,4% de los aislamientos presentó morfología lisa, de los cuales un 70% de los aislamientos correspondían al grupo abscessus-chelonae y un 30% al grupo fortuitum. Basándonos en estos porcentajes vemos que la morfología de la colonia parece ser independiente del grupo al que pertenecen los aislamientos y a su vez de la especie de MCR. Si relacionamos la morfología de la colonia con el hecho de que el aislamiento presente o no el fenómeno de policlonalidad, comprobamos que no existe una relación estadísticamente significativa que pueda asociar la policlonalidad con una morfología determinada ($P=0,64$, Test exacto de Fisher).

Un suceso interesante es la aparición de morfología mixta, tanto macroscópicamente como microscópicamente, en uno de los aislamientos policlonales (FJD-17). Este aislamiento se corresponde con una cepa de *M. mucogenicum* y presentó para tres de sus clones morfología lisa mientras que los otros tres mostraron colonias con morfología rugosa.

Tabla 8. Características fenotípicas de los aislamientos monoclonales.

AISLAMIENTO	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (días)	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
FJD-1	5	L	R
FJD-2	6	R	R
FJD-3	3	R	R
FJD-4	4	R	R
FJD-5	3	R	R
FJD-6	7	L	L
FJD-7	4	R	R
FJD-8	3	R	R
HUVM-1	3	R	R
HVH-1	6	L	L
HVH-2	7	L	L
HVH-3	3	R	R
HVH-4	5	L	L
HVH-5	5	L	L
HVH-6	5	L	L
HVH-7	5	L	L
HVH-8	3	R	R
HULP-1	5	R	R
FJD-9	4	L	R
HCZ-1	4	R	R
FJD-10	4	R	R
FJD-11	6	R	R
HCZ-2	6	L	L
HCZ-3	5	R	R
HCZ-4	4	R	R
HCZ-5	4	L	R
FJD-16	4	L	L

*L= morfología lisa; R= morfología rugosa.

Tabla 9. Características fenotípicas de los diferentes clones identificados en los aislamientos policlonales.

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO					VELOCIDAD DE CRECIMIENTO				
AISLAMIENTO	CLON	(días)	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	AISLAMIENTO	CLON	(días)	MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
HVH-9	1	4	R	R	FJD-15	1	5	R	R
	2	5	R	R		2	7	R	R
	3	5	R	R		3	7	R	R
	4	4	R	R		4	6	R	R
	5	5	R	R		5	5	R	R
	6	5	R	R		6	4	R	R
FJD-12	1	3	R	R	HCZ-6	7	5	R	R
	2	5	R	R		8	5	R	R
	3	3	R	R		1	6	R	R
FJD-13	1	5	L	L		2	5	R	R
	2	6	L	L		3	3	R	R
	3	3	L	L		4	3	R	R
	4	3	L	L		5	3	R	R
	5	6	L	L		6	4	R	R
	6	3	L	L		7	3	R	R
	7	6	L	L		8	4	R	R
FJD-14	8	3	L	L		9	5	R	R
	1	5	R	R		10	6	R	R
	2	4	R	R	11	7	R	R	
	3	5	R	R	FJD-17	1	7	L	L
	4	3	R	R		2	4	R	R
	5	4	R	R		3	6	L	L
	6	6	R	R		4	3	R	R
	7	7	R	R		5	6	R	R
8	7	R	R	6		6	L	L	

*L= morfología lisa; R= morfología rugosa.

4.5 DETECCIÓN DE GENES DE LAS METILASAS *erm*

La determinación de la presencia de genes *erm* se llevo a cabo mediante la utilización de los cebadores CME-1Y y CME-2 descritos para dicha familia de genes. La presencia de estos genes se evidencia cuando aparece un producto de amplificación de 175 pb para lo cual se utilizó un marcador de peso molecular. Esta detección se llevo a cabo en todos los aislamientos monoclonales así como en los 50 clones detectados entre los 7 aislamientos policlonales.

A continuación en la Figura 11, podemos observar la detección de genes *erm* en los diferentes clones de los aislamientos HCZ-6 y FJD-15 ambos identificados como *M. fortuitum*. Se observa que en todos los clones del aislamiento FJD-15 aparece la banda correspondiente a los genes *erm* (175pb) mientras que ninguno de los clones del aislamiento HCZ-6 presenta dicha banda.

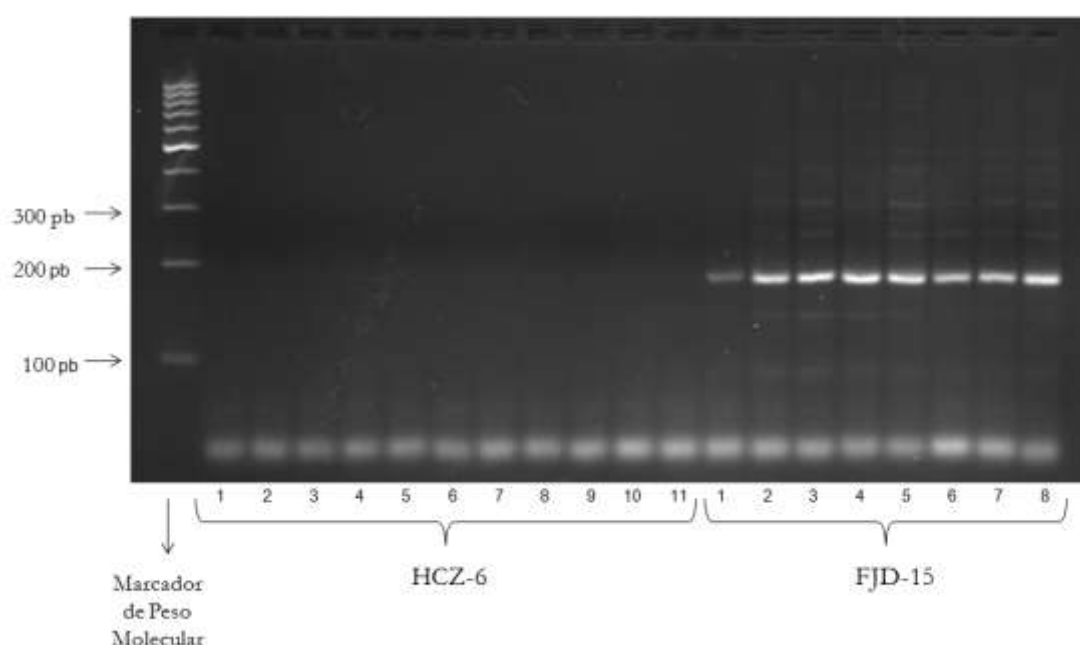


Figura 12. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa de la detección del gen *erm* en los aislamientos HCZ-6 y FJD-15.

De entre los aislamientos monoclonales sólo 7 presentaron la banda de amplificación correspondiente a genes *erm*, lo que supone un 25,9% de las cepas. Los seis aislamientos monoclonales de la especie *M. fortuitum* fueron positivos para la detección de dichos genes. Por otro lado, la presencia de genes *erm* solo se detectó en un aislamiento de *M. abscessus* (5,5%). Si relacionamos la presencia de dichos genes con los puntos de corte sugeridos por el CLSI para la claritromicina, de los siete aislamientos positivos tres de ellos presentaban valores de CMI considerados resistentes para la claritromicina (HULP-1, HCZ-3 y FJD-11), uno presentó un valor intermedio (FJD-10) y los otros tres resultaron ser sensibles a dicho antibiótico (HCZ-2, HCZ-4 Y HCZ-5). La presencia de estos genes en el grupo de aislamientos monoclonales se relaciona claramente con la resistencia a claritromicina ($P=0,0019$, Test exacto de Fisher) ya que ninguno de los aislamientos que no presentaban estos genes tenían valores de CMI para la claritromicina resistentes.

En el grupo de aislamientos policlonales, no hubo mucha variabilidad entre clones exceptuando el caso de la cepa FJD-17, *M. mucogenicum*, en el que tres de sus clones (2, 4 y 5) fueron positivos en la detección de genes *erm* a pesar de que todos los clones presentaron un valor de CMI sensible para la claritromicina, si bien es cierto que los tres clones con genes *erm* tenían valor de CMI un poco mayores dentro de la sensibilidad. De los otros seis aislamientos, en cuatro de ellos se detectó la presencia de estos genes (FJD-12, FJD-13, FJD-14 y FJD-15) todos ellos pertenecientes a la especie *M. fortuitum*. En este grupo, en cuanto a la relación con los valores de CMI para la claritromicina, observamos que a pesar de la presencia de estos genes la resistencia a claritromicina es mínima ya que sólo fueron resistentes tres de los ocho clones de la cepa FJD-15 con unos valores de CMI de 8 µg/ml.

4.6 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD INVASIVA EN EL MODELO DE MICROCOLONIAS EN FIBROBLASTOS HUMANOS COMO FACTOR DE PATOGENICIDAD

La capacidad de invasión de fibroblastos humanos fue estudiada para los 77 clones, 27 aislamientos monoclonales y los 50 clones detectados en los 7 aislamientos policlonales. La medición de los diámetros de las colonias se llevo a cabo en las fotografías tomadas trascurridas 96h de incubación. Así pues se obtuvieron unos valores de entre 61,057 px y 809,711 px (ancho), y 88,544 px y 942,117 px (largo) para las cepas monoclonales, y de entre 123,548 px y 551,144 px (ancho) y 134,164 px y 629,679 px (largo) para los diferentes clones de los aislamientos que resultaron ser policlonales. Después se calculó la relación Largo/Ancho para cada una de las colonias medidas con el objeto de conocer su tendencia a la elongación, considerándose la colonia redonda cuando la relación es 1 y la presencia de tendencia a la elongación se cuando la relación resultaba mayor a 1,2 (Figuras 11 y 12). Esta relación varió entre 1,000 y 1,880 entre las cepas monoclonales y entre 1,000 y 1,571 entre las cepas policlonales.

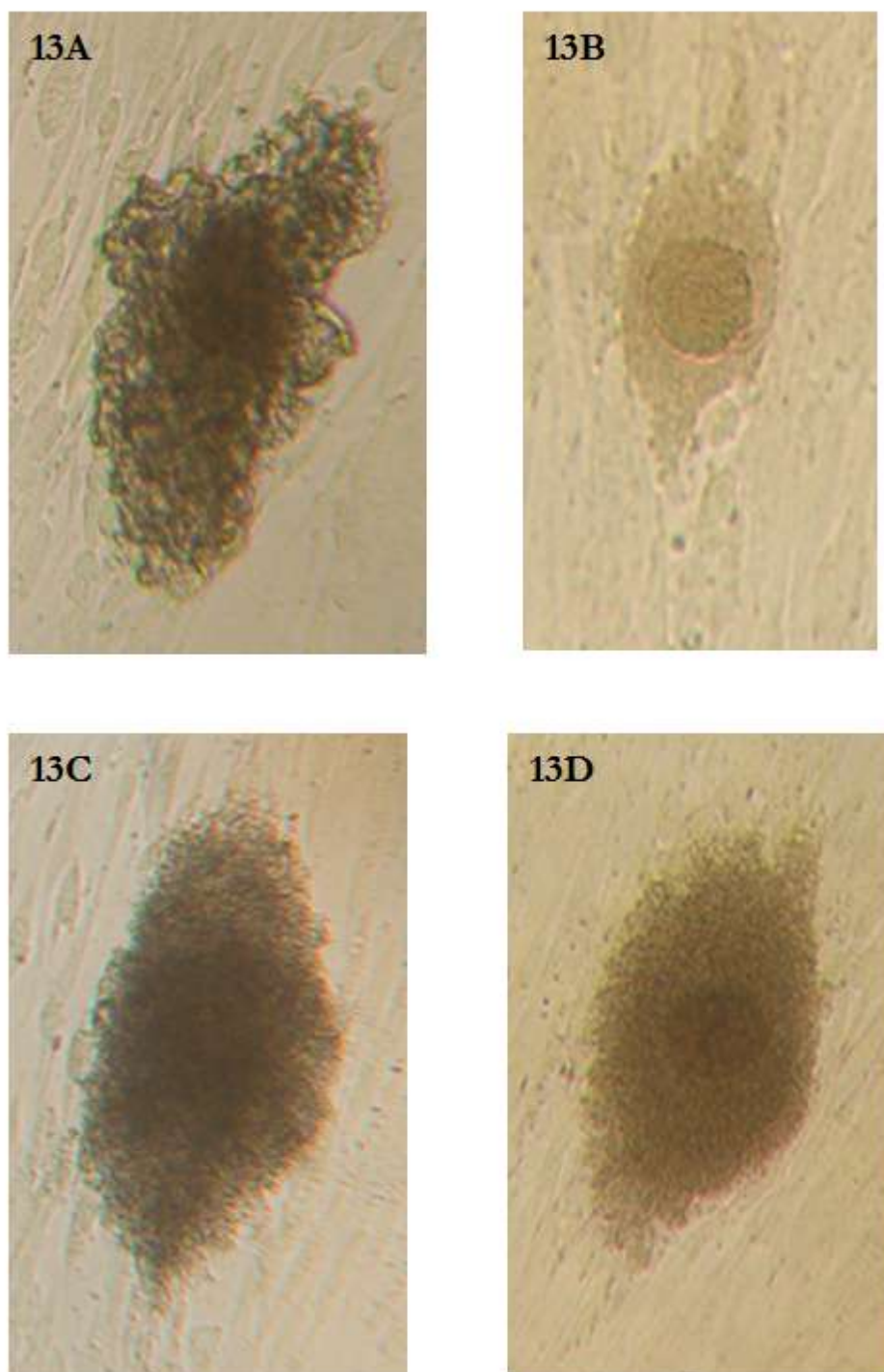


Figura 13. Aspecto de las microcolonias alargadas en fibroblastos. **13A y 13B:** colonias alargadas de *M. abscessus* cepas FJD-3 y HVH-2 respectivamente. **13C:** colonia alargada de *M. fortuitum*, cepa HCZ-5. **13D:** colonia alargada de *M. mucogenicum*, cepa FJD-16.

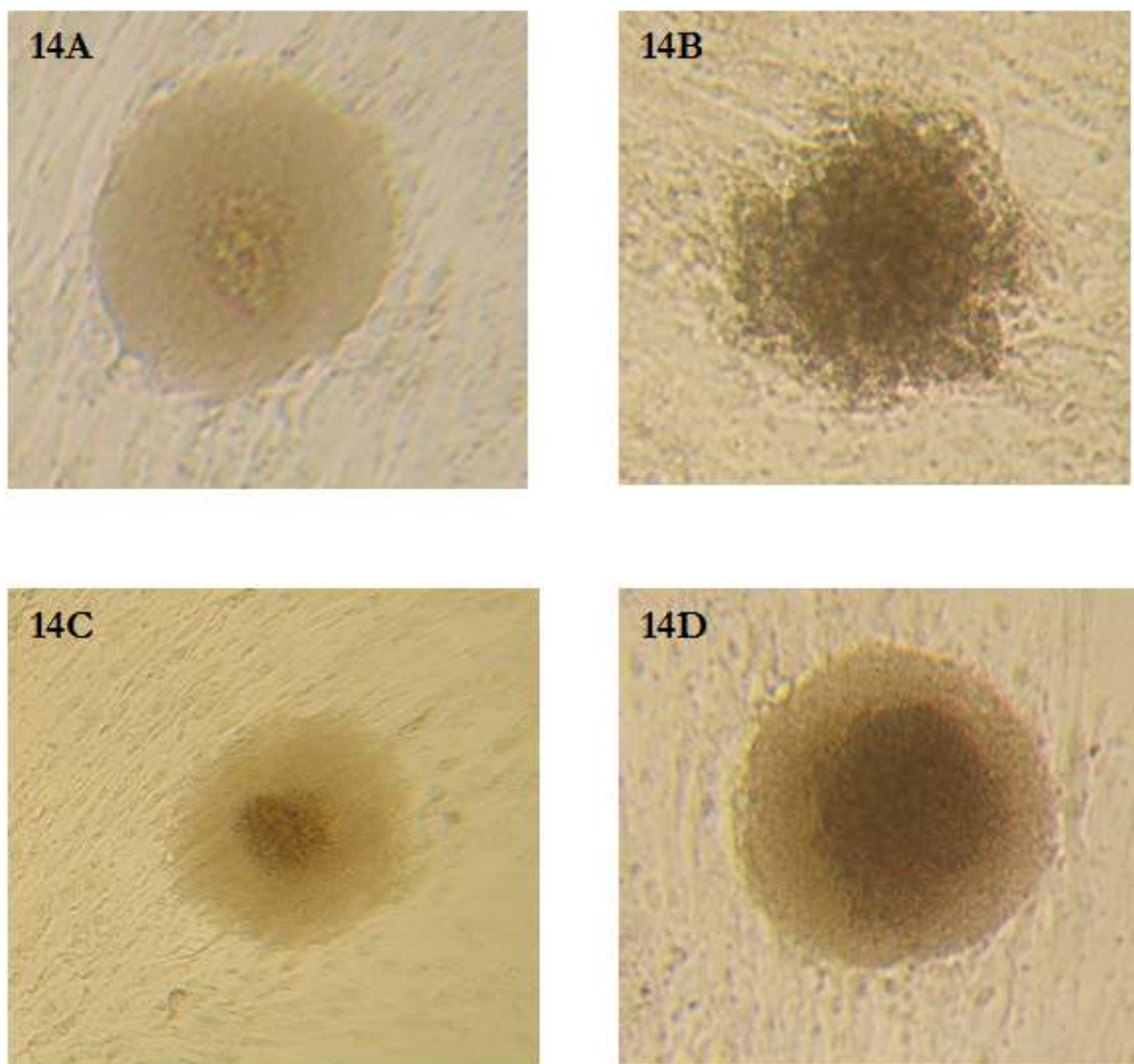


Figura 14. Aspecto de las microcolonias redondeadas en fibroblastos. **14A y 14B:** colonias redondeadas de *M. abscessus* cepas HVH-5 y FJD-7 respectivamente. **14C y 14D:** colonias redondeadas de *M. fortuitum* cepas HCZ-3 y FJD-13 respectivamente.

Dentro de los aislamientos monoclonales, 15 de ellos presentaron colonias con una relación Largo/Ancho $> 1,2$, el 73,3% fueron cepas de *M. abscessus*. Dichos aislamientos se recogen en la Tabla 10.

Tabla 10. Aislamientos monoclonales con relación largo/ancho $> 1,2$.

AISLAMIENTO	ESPECIE	Largo/Ancho
FJD-1	<i>M.abscessus</i>	1,633
FJD-3	<i>M.abscessus</i>	1,809
FJD-4	<i>M.abscessus</i>	1,367
FJD-5	<i>M.abscessus</i>	1,266
FJD-6	<i>M.abscessus</i>	1,653
FJD-8	<i>M.abscessus</i>	1,561
FJD-9	<i>M.chelonae</i>	1,7
FJD-16	<i>M.mucogenicum</i>	1,88
HCZ-2	<i>M.fortuitum</i>	1,231
HCZ-5	<i>M.fortuitum</i>	1,831
HUVM-1	<i>M.abscessus</i>	1,493
HVH-1	<i>M.abscessus</i>	1,238
HVH-2	<i>M.abscessus</i>	1,53
HVH-3	<i>M.abscessus</i>	1,805
HVH-6	<i>M.abscessus</i>	1,227

En cuanto a los aislamientos policlonales únicamente uno de ellos mostró tendencia a la elongación en todos sus clones. Se trata del aislamiento HVH-9 cuyas proporciones entre el largo y el ancho de las colonias variaron entre 1,216 y 1,571. Por otro lado, seis de los once clones de la cepa HCZ-6 (clon 4, 5, 8, 9, 10 y 11) con una relación Largo/Ancho de entre 1,324 y 1,499.

Con el objetivo de conocer la posible asociación entre la capacidad de invasión celular y la patogenicidad de los aislamientos (entendida como existencia de significación clínica), se realizó el test exacto de Fisher obteniéndose una $P=0,029$, lo que reafirma la capacidad invasiva como factor de patogenicidad. Por otro lado, también resultó estadísticamente significativa ($P=0,038$, Test exacto de Fisher) la relación de esta capacidad invasiva con el grupo abscessus-chelonae. Sin embargo, al intentar emparejarlo con la policlonalidad no se obtuvo relación alguna ($P=0,09$).

4.7 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE DESARROLLAR BIOPELÍCULAS COMO FACTOR DE PATOGENICIDAD

Se analizó la capacidad de desarrollar biopelículas de los 27 aislamientos monoclonales incluidos en el estudio así como de los 50 clones diferenciados en los 7 aislamientos policlonales. Del total de 77 clones que fueron sometidos al ensayo, el 49,35% (38 clones) fueron capaces de formar una biopelícula en las condiciones propuestas en el experimento mientras que el 50,65% (39 clones), prácticamente la mitad, no fueron capaces de desarrollarla. Si realizamos la misma valoración por aislamientos, dividiendo los aislamientos policlonales en dos grupos (aquellos en los que ningún clon forma biopelícula y aquellos en los que alguno de sus clones si posee esta capacidad), los resultados son muy similares, el 47,05% (16 aislamientos) presentaban la capacidad de formar biopelícula mientras que el 52,95% (18 aislamientos) no lo lograron.

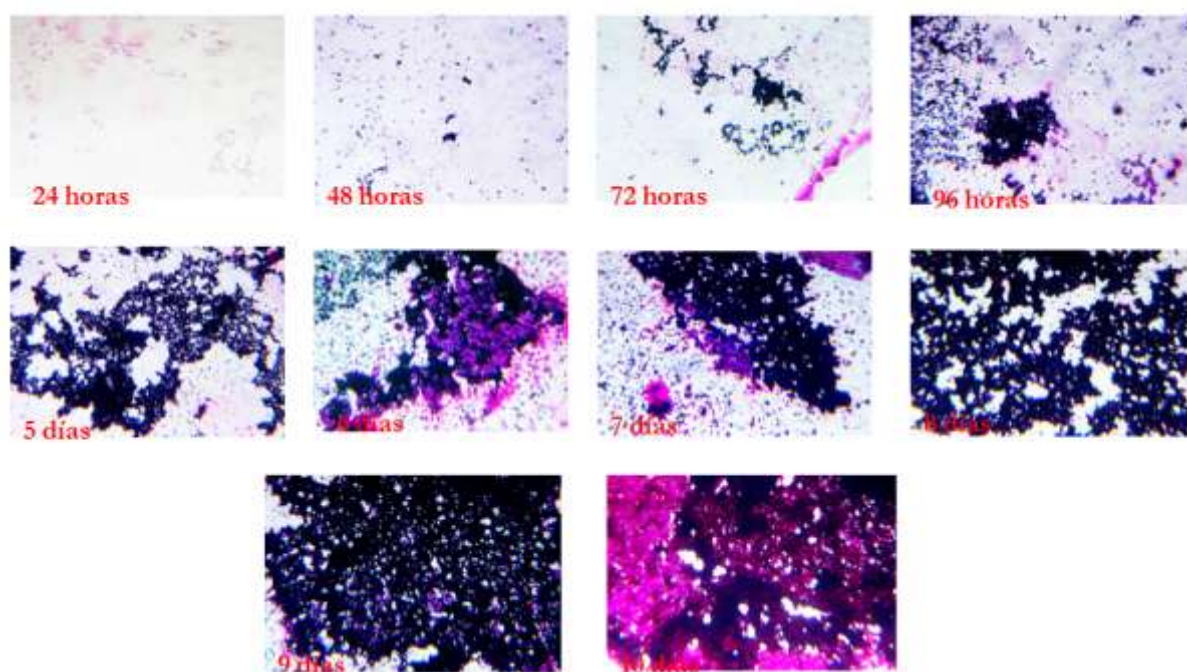


Figura 15. Desarrollo de una biopelícula de *M. fortuitum* (cepa HCZ-3).

Si comparamos estos datos, para todos los aislamientos, con otros parámetros definidos anteriormente encontramos que la capacidad de desarrollar biopelículas se relaciona con el fenómeno de la policlonalidad ($P= 0,0348$) así como con el hecho de pertenecer al grupo *fortuitum* ($P=0,00108$). Estas premisas hacen que la ausencia de esta capacidad de formar biopelículas se relacione en nuestro estudio con el significado clínico de los aislamientos ($P=0,00919$).

Realizando un análisis descriptivo de los datos (Tablas 11 y 12), sólo hubo un aislamiento policlonal en el que ninguno de los clones fue capaz de formar biopelícula, se trata del aislamiento FJD-12, una cepa de *M. fortuitum* aislada de una muestra respiratoria. Cabe destacar el caso de los dos aislamientos de *M. chelonae* (FJD-9 y HCZ-1) ambos reúnen tres características importantes, son clínicamente significativos y tienen la capacidad de formar biopelículas así como la capacidad de invasión celular. Sólo dos de los diecinueve aislamientos de *M. abscessus* reunían también estas tres características siendo además monoclonales y de origen respiratorio (FJD-5 Y HVH-3).

Tabla 11. Aislamientos monoclonales: capacidad invasiva y capacidad de desarrollar biopelículas.

CEPA	ESPECIE	CAPACIDAD INVASIVA	CAPACIDAD DE DESARROLLAR BIOPELÍCULAS
FJD-1	<i>M. abscessus</i>	SI	NO
FJD-2	<i>M. abscessus</i>	NO	NO
FJD-3	<i>M. abscessus</i>	SI	NO
FJD-4	<i>M. abscessus</i>	SI	NO
FJD-5	<i>M. abscessus</i>	SI	SI
FJD-6	<i>M. abscessus</i>	SI	NO
FJD-7	<i>M. abscessus</i>	NO	NO
FJD-8	<i>M. abscessus</i>	SI	NO
HUVM-1	<i>M. abscessus</i>	SI	NO
HVH-1	<i>M. abscessus</i>	SI	NO
HVH-2	<i>M. abscessus</i>	SI	NO
HVH-3	<i>M. abscessus</i>	SI	SI
HVH-4	<i>M. abscessus</i>	NO	NO
HVH-5	<i>M. abscessus</i>	NO	NO
HVH-6	<i>M. abscessus</i>	SI	NO
HVH-7	<i>M. abscessus</i>	NO	NO
HVH-8	<i>M. abscessus</i>	NO	NO
HULP-1	<i>M. abscessus</i>	NO	NO
FJD-9	<i>M. chelonae</i>	SI	SI
HCZ-1	<i>M. chelonae</i>	NO	SI
FJD-10	<i>M. fortuitum</i>	NO	SI
FJD-11	<i>M. fortuitum</i>	NO	SI
HCZ-2	<i>M. fortuitum</i>	SI	SI
HCZ-3	<i>M. fortuitum</i>	NO	SI
HCZ-4	<i>M. fortuitum</i>	NO	SI
HCZ-5	<i>M. fortuitum</i>	SI	SI
FJD-16	<i>M. mucogenicum</i>	SI	NO

Tabla 12. Aislamientos policlonales: capacidad invasiva y capacidad de desarrollar biopelículas.

AISLAMIENTO	CLON	CAPACIDAD INVASIVA	CAPACIDAD DE DESARROLLAR BIOPELÍCULAS	AISLAMIENTO	CLON	CAPACIDAD INVASIVA	CAPACIDAD DE DESARROLLAR BIOPELÍCULAS
HVH-9	1	SI	SI	FJD-15	1	NO	NO
	2	SI	SI		2	NO	NO
	3	SI	NO		3	NO	NO
	4	SI	SI		4	NO	SI
	5	SI	NO		5	NO	SI
	6	SI	NO		6	NO	NO
FJD-12	1	NO	NO	HCZ-6	7	NO	NO
	2	NO	NO		8	NO	SI
	3	NO	NO		1	NO	SI
FJD-13	1	NO	SI		2	NO	NO
	2	NO	SI		3	NO	NO
	3	NO	SI		4	NO	SI
	4	NO	NO		5	NO	SI
	5	NO	SI		6	NO	SI
	6	NO	SI		7	NO	SI
	7	NO	SI		8	NO	SI
	8	NO	SI		9	NO	SI
FJD-14	1	NO	NO		10	NO	NO
	2	NO	SI	FJD-17	11	NO	SI
	3	NO	SI		1	NO	SI
	4	NO	NO		2	NO	NO
	5	NO	SI		3	NO	SI
	6	NO	NO		4	NO	NO
	7	NO	NO		5	NO	NO
	8	NO	SI		6	NO	SI

5. DISCUSIÓN

5.1 SIGNIFICADO CLÍNICO DE LAS DISTINTAS ESPECIES Y SU RELACIÓN CON LA POLICLONALIDAD

Las micobacterias de crecimiento rápido pueden causar una amplia variedad de enfermedades en humanos, tal y como se recoge en la literatura científica (173-178). Siguiendo esta línea, la serie de MCR que se incluyen en nuestro estudio abarca diversos cuadros clínicos, desde infecciones respiratorias hasta conjuntivitis pasando por infecciones de piel y partes blandas, así como un caso de artritis. Sin embargo, es de destacar que predominan claramente las infecciones respiratorias producidas por *M. abscessus*. En relación a este claro predominio sobre las otras especies, es importante señalar que *M. abscessus* es un patógeno emergente responsable de infecciones pulmonares, con mayor frecuencia en pacientes con patologías de base tales como fibrosis quística, bronquiectasias, y enfermedad pulmonar crónica obstructiva (179-180), y también está descrito en pacientes sin la situación pulmonar comprometida (181). En pacientes con fibrosis quística, puede llegar a representar la mitad de las infecciones causadas por MNT y hasta el 95% de aquellas que son causadas por MCR (182). Por otro lado puede conducir a una rápida disminución de la función respiratoria y recaídas en pacientes sometidos a trasplante de órganos (183-184). Dejando a un lado la patología pulmonar, esta MCR es también responsable de infecciones extrapulmonares relacionadas principalmente con procedimientos quirúrgicos y cosméticos (185).

Basándonos en los resultados obtenidos en nuestra experiencia, y como ha sido publicado recientemente (186), podemos afirmar que existe una clara relación entre el hecho de que los aislamientos que resultaban ser monoclonales eran a su vez aquellos en los que la MCR aislada era la responsable de un cuadro clínico infeccioso. Esta relación podría explicarse si se considera que existe una selección natural de la cepa más virulenta, tras lo cual se desarrollaría la enfermedad. Al contrario de lo que sucedería en una situación de

policlonalidad y que como demuestran los datos obtenidos en la gran mayoría de los casos los aislamientos no presentan significado clínico y se corresponden más bien con hallazgos casuales debidos a situaciones de colonización o contaminación. Es más, esta relación va mucho más allá ya que la monoclonalidad del aislamiento se relaciona con especies con mayor potencial patogénico y que pertenecen al grupo que hemos denominado *abscessus-chelonae*, mientras que los aislamientos policlonales pertenecen al grupo *fortuitum*, menos agresivo y más ampliamente relacionado con estados de colonización (187-188).

5.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES POR MCR: FORMA DE ADQUISICIÓN Y LA IMPLICACIÓN DE LA PRESENCIA DE UNO O VARIOS CLONES

A pesar de las nuevas líneas de investigación que han surgido en los últimos tiempos y que apoyan la existencia de la transmisión entre personas (189-190), hoy por hoy sigue vigente la idea de que las infecciones producidas por MCR surgen a partir de fuentes de infección ambientales. Si asumimos que la fuente de infección es ambiental (191-193) y que en la naturaleza podríamos encontrar una mezcla de varios clones diferentes de la misma especie, cabría esperar que estos mismos clones estén presentes en los primeros estadios de colonización. Después de este primer contacto podrían ocurrir dos situaciones. Por un lado, en aquellos casos en los que las especies tengan un perfil patogénico, el clon más virulento podría sobreponerse a los demás aumentando su presencia por selección natural y finalmente acabar siendo el único causante de la infección. Esto implicaría que, en las muestras obtenidas de estos pacientes, cabría esperar el aislamiento de un único clon y por tanto se trataría de aislamientos clínicamente significativos monoclonales, tal y como aparece en este estudio. Por otro lado, cuando las especies son menos patogénicas, la mezcla ambiental de los clones de dichas especies podría coexistir y diseminarse

conjuntamente, lo que llevaría a aislar en las muestras clínicas de estos pacientes diferentes clones de la misma especie de MCR, lo que se traduce en aislamientos policlonales sin significado clínico.

Recientes investigaciones en pacientes con fibrosis quística sugieren la posibilidad de transmisión persona-persona (14, 194). Este hecho apoyaría aun más la hipótesis de selección del clon más virulento siendo este el único que se transmitiría a otro hospedador no proviniendo directamente del medio ambiente. En la población que abarca nuestro estudio sólo encontramos un caso de fibrosis quística (HULP-1), se trata de una infección causada por una cepa rugosa de *M. abscessus* que presentó un comportamiento monoclonal.

En un estudio llevado a cabo en 1993 en pacientes con SIDA se describió la presencia de dos casos de bacteriemia en los que se detectó más de un clon del complejo *Mycobacterium avium* utilizando como técnica de estudio la PFGE (195). Los autores consideran que se subestima la frecuencia con la que se da este fenómeno debido a que, por la dificultad que conlleva trabajar con estos microorganismos, sólo se pudieron salvar 3 colonias intactas de los cultivos. Partiendo de la misma premisa en cuanto al origen medioambiental de las cepas, estos casos de bacteriemia policlonal podrían reflejar el desarrollo secuencial de una infección en el paciente con un sistema inmunológico seriamente comprometido. Por otro lado, en los pacientes en los que el sistema inmunológico se mantiene intacto, este lucharía contra la infección de manera que contribuiría a la selección del clon más “resistente”. Volviendo a los datos obtenidos tras la realización de este estudio, contamos con un aislamiento que aún siendo clínicamente significativo resulto presentar un comportamiento policlonal con 6 clones diferentes. Se trata de una infección respiratoria por *M. abscessus* pero se desconoce el estado inmunológico del paciente así como su situación basal.

5.3 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Los métodos de tipificación se pueden clasificar en dos grandes grupos: fenotípicos (basados en características fisiológicas o bioquímicas) y genotípicos (basados en el estudio del ADN). Los métodos fenotípicos son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación debido a que la expresión del carácter fenotípico es el resultado del genotipo con el ambiente y por tanto es susceptible de sufrir modificaciones.

Hoy en día se dispone de varias técnicas de tipificación basadas en la PCR que pueden utilizarse como métodos preliminares para el estudio de la relación clonal entre microorganismos de una misma especie. La PFGE gracias a su excelente reproductibilidad y elevado poder de discriminación, es la técnica estándar de referencia para tipificar la mayoría de bacterias, hongos y parásitos con importancia clínica (196-197). A pesar de lo cual, las técnicas de tipificación basadas en PCR son ampliamente utilizadas ya que, por lo general, estas técnicas poseen un elevado poder discriminatorio, son menos laboriosas y más rápidas y flexibles que la PFGE y además permiten trabajar con un mayor número de muestras (57-58). Múltiples estudios han comparado esta técnica con las técnicas de tipificación basadas en PCR (198-202). En este sentido, las técnicas de PCR son útiles para diferenciar grupos de cepas no relacionadas clonalmente, pero son menos discriminativas que la PFGE para diferenciar subtipos entre cepas relacionadas clonalmente (203). Los principales problemas que presentan estas técnicas son metodológicos, relacionados con la inhibición de la PCR y la contaminación de las muestras durante el proceso de preamplificación. Además algunas de ellas, tienen que ser validadas en cada laboratorio debido a su baja reproductibilidad, mientras que otras pueden requerir la utilización de un *software* adecuado para analizar los patrones de bandas de ADN que son complejos y difíciles de interpretar visualmente (204).

Centrándonos en las características que presentan las diferentes técnicas, destacar que las PCR que utilizan cebadores arbitrarios, entre las que se encuentra el RAPD, y aquellas que utilizan cebadores que hibridan secuencias de ADN repetidas (rep-PCR) son las técnicas más utilizadas para tipificar inicialmente bacterias y hongos por su rapidez y facilidad de realización (205-207).

Dentro de las técnicas de PCR con aplicaciones en el campo de la epidemiología molecular, aparte de los métodos basados en cebadores arbitrarios que son los utilizados en este estudio, cabe destacar la rep-PCR, en la cual se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas o repetitivas (secuencias rep) y que se encuentran repartidas por el cromosoma de muchas enterobacterias y algunas bacterias grampositivas y hongos (208-209). Las secuencias repetitivas palindrómicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias rep que más se han utilizado en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos (210-212). El análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) está basado en la amplificación mediante PCR de fragmentos de restricción generados a partir de ADN cromosómico a los que previamente se les ha unido unos adaptadores que hibridan con cebadores específicos (213-214). Existen variaciones metodológicas de esta técnica pero, a pesar de todo, su laboriosidad y el elevado coste del quipo así como la obtención de patrones muy complejos relegan esta técnica fundamentalmente a centros de referencia. Finalmente, el aumento de la disponibilidad de secuencias de genoma completo de múltiples microorganismos aumenta la aplicación potencial de la comparación de genoma completo en el campo de la epidemiología a pesar de que sus aplicaciones se centran en el área de la filogenética y la taxonomía (215-218), actualmente está ganando terreno como herramienta de tipificación bacteriana en el campo de la epidemiología molecular (219-220).

Los problemas de reproducibilidad asociados a la técnica seleccionada para llevar a cabo este estudio, RAPD, se minimizaron siguiendo las estrategias que se señalan en diferentes publicaciones y tratados (101-102). Por un lado las condiciones en las que se llevó a cabo la metodología estaban perfectamente estandarizadas siguiendo un protocolo preestablecido y anteriormente validado (172), el ADN objeto de estudio procedía en cada caso de una única colonia y antes de proceder a la comparación de los diferentes aislados se estandarizó la concentración de dicho ADN molde después de determinar la concentración que contenía cada muestra. Por otro lado, todas las colonias procedentes de un mismo aislamiento se amplificaron simultáneamente y se analizaron en un mismo gel lo que hizo posible la comparación entre patrones de bandas de ADN y por último se compararon tras utilizar tres cebadores diferentes, lo que aumentó la resolución de la técnica ya que se comparan varios patrones para una misma muestra. Esta técnica se considera óptima y muy útil como método inicial de tipificación para el estudio de la relación clonal entre aislados de una misma especie.

5.4 IMPLICACIONES DEL ESTUDIO

La presencia de policlonalidad en un aislamiento influye en su comportamiento así como en sus características fenotípicas, haciendo a cada clon único. A lo largo del estudio de diferentes factores de patogenicidad hemos podido comprobar que la presencia o ausencia de las mismos confiere una identidad propia a cada aislamiento que probablemente tenga una repercusión en la capacidad causar infección de cada cepa, la virulencia con la que se desarrollará dicha infección y la manera en la que se debe plantear la lucha contra la misma. El manejo de las infecciones por MCR requiere el uso de terapia antimicrobiana, la cual resulta diferente de aquella que se utiliza habitualmente para el tratamiento de la tuberculosis u otras micobacterias de crecimiento lento (221). Los estudios de sensibilidad

in vitro, han mostrado que existen diferentes patrones de sensibilidad dentro de las especies de este grupo. A pesar de estos patrones, hay una importante variabilidad entre cepas por lo que se recomienda el estudio de sensibilidad de los aislamientos significativos para poder establecer la mejor pauta terapéutica posible (17). Centrándonos en nuestra experiencia, las cepas monoclonales parecen mostrar una tendencia a presentar mayores valores de CMI para los antibióticos estudiados y por tanto resultan ser ligeramente más resistentes que los aislamientos policlonales. Esto una vez más puede estar relacionado con la mayor virulencia de los aislamientos monoclonales que podría verse aumentada por una mayor resistencia a los antimicrobianos. Cabe destacar el caso de ciprofloxacino, para el cual hay una clara tendencia, estadísticamente significativa, a la resistencia por parte de las cepas monoclonales. Este hecho encuentra justificación en que la mayoría de aislamientos monoclonales pertenecen al grupo abscessus-chelonae y hay que recordar que *M. abscessus* y *M. chelonae* muestran con frecuencia resistencia a las quinolonas (18, 222-223). A tener en cuenta también, que linezolid es el único fármaco frente al cual ninguno de los clones estudiados resulta resistente si bien es verdad que existen algunos casos de CMIs intermedias. Nuevos estudios sugieren considerar este antibiótico como parte de posibles terapias de combinación de próxima generación (224). Como se recomienda basar los tratamientos en estudios de sensibilidad individuales para cada aislamiento, y de acuerdo con nuestros resultados, deberían seleccionarse varias colonias para ser testadas, esto podría evitar falsos resultados que condujesen finalmente a potenciales fallos terapéuticos. Por otro lado, son bien conocidos los problemas que acarrea el tratamiento de las infecciones pulmonares por *M. abscessus*, en gran parte debido a su comportamiento refractario frente al tratamiento con antibióticos (225-226). Este microorganismo presenta múltiples mecanismos de resistencia innatos siendo una metilasa inducible codificada por el gen *erm* el más importante que se ha descrito hasta ahora (120, 123-124, 227). La presencia de este gen puede hacerles parecer sensibles a los macrólidos en las pruebas iniciales *in vitro*,

volviéndose resistentes después de la exposición a los mismos. Los malos resultados a la hora de erradicar *M. abscessus* una vez establecida la infección parecen deberse en gran medida a la expresión de estos genes (228). En nuestra experiencia, la presencia de genes *erm* es bastante inferior a lo que cabría esperar y se detectó en mayor medida en clones de la especie *M. fortuitum*. Como se ha señalado con anterioridad la detección de este gen hace esperar una resistencia *in vivo* al tratamiento con macrólidos a pesar de que en el estudio de sensibilidad la cepa se muestre como sensible, hecho que también está ampliamente descrito para *M. fortuitum* (123).

Continuando con las características morfológicas de las colonias y como indica la literatura en el caso de *M. abscessus*, las colonias rugosas se han asociado mayoritariamente con casos de infecciones graves y persistentes (229), y este hecho se detecta más frecuentemente si los aislamientos son de origen respiratorio. En nuestra experiencia no hemos encontrado relación alguna entre la morfología de la colonia y el fenómeno de la policlonalidad. Es más, la morfología de la colonia no tiene poder estadístico a la hora de predecir la posible implicación clínica, como ya ha quedado recogido en estudios anteriores (230). La diferencia en cuanto a la velocidad de crecimiento, que no sigue ningún patrón concreto que pueda relacionarse con la especie o el grupo, por parte de los diferentes clones puede tener implicaciones prácticas a la hora de llevar a cabo el análisis microbiológico, ya que aquellos clones que crecen a mayor velocidad son más fáciles de localizar y dificultarían la detección que aquellos que necesitan más tiempo para crecer.

A pesar de la importancia de estas bacterias como patógenos humanos, existen muy pocos estudios *in vitro* dedicados a describir los mecanismos específicos de patogenicidad (139, 147). En este sentido, la capacidad de las micobacterias de penetrar y sobrevivir dentro de las células ha sido ampliamente estudiada, en especial en *M. tuberculosis*, pero también en otras especies de micobacterias (231-235). Algunos de estos estudios determinaron que la

presencia en los cultivos de microcolonias alargadas se relacionaba con un mayor potencial patogénico de la cepa, ya que esta disposición evidenciaba la capacidad de la bacteria para invadir las células. En cambio una morfología redondeada señala la ausencia de invasión celular (142-143). Sin embargo, en anteriores estudios se determinó que la capacidad invasiva estaba presente solamente en unas pocas cepas de micobacterias, y no se estableció como una característica esencial para que dichas cepas fuesen causa de enfermedad en humanos (144). A pesar de esto, en nuestra experiencia la capacidad invasiva se postula como un claro factor de patogenicidad que contribuye, junto con otros factores, a la virulencia de los clones que la poseen, tal y como indica su clara relación con el significado clínico de los aislamientos. Es más, el hecho de que el único aislamiento policlonal con significado clínico presente esta capacidad apoya esta afirmación.

Hay que tener en cuenta que el que muchas de las infecciones causadas por MCR estén asociadas con la presencia de cuerpos extraños, como catéteres o prótesis (236-238), indicaría que la adherencia a estas superficies puede representar un papel esencial en el desarrollo de la enfermedad. Tras este proceso de adhesión ocurriría el consiguiente desarrollo de una biopelícula planteando serios problemas a la hora de erradicar dicha infección. La capacidad de desarrollar biopelículas por parte de estos microorganismos constituye por tanto un importante factor de patogenicidad. Sin embargo nuestro estudio, que no incluye ningún caso de infección relacionada con la presencia de un cuerpo extraño, sugiere que esta capacidad de formar biopelículas está más relacionada con los casos de colonización o contaminación que con aquellos en los que la micobacteria tiene una clara implicación en la patología. Dado que se presupone que la gran mayoría de los microorganismos son capaces de producir biopelículas (239-240), cabe puntualizar que las cepas estudiadas que no forman biopelículas quizás sí que son capaces de desarrollarlas en otras condiciones de temperatura, nutrientes, pH, etc. Por otro lado, existe una relación entre esta capacidad y el fenómeno de policlonalidad, es decir, los microorganismos que

procediendo de una fuente ambiental acaban ubicados en un espacio anatómico humano conservan la capacidad de formar biopelículas, cualidad que potencia la aparición de colonización. Nuestro estudio sugiere que, mientras que el grupo abscessus-chelonae se relaciona con la capacidad de invasión celular, el grupo fortuitum se relaciona con la capacidad de desarrollar biopelículas. A pesar de esta distribución, cuatro aislamientos reunían ambos factores de patogenicidad y fueron clínicamente significativos. Se desconoce el desenlace final de la infección, ni si el hecho de que estas cepas presentaran una mayor predisposición a la virulencia hizo la resolución de la infección más tortuosa.

Actualmente se desconoce el alcance que puede tener el efecto de la policlonalidad en las infecciones causadas por las MCR. Serán necesarios más estudios en el futuro para dilucidar la exacta dimensión de este fenómeno.

6. CONCLUSIONES

1. La policlonalidad parece ser un hecho excepcional dentro de los aislamientos clínicamente significativos de MCR, pero es relativamente común en aquellos aislamientos que no tienen ninguna implicación clínica.
2. Los aislamientos con implicación clínica directa están no sólo relacionados con la presencia de un único clon, sino que además, pertenecen a las especies *M. abscessus* y *M. chelonae*.
3. En los aislamientos que carecen de significado clínico es posible, en gran medida, detectar más de un clon de la misma especie de micobacteria. Además se relacionan con especies pertenecientes al grupo fortuitum que, aunque es bien conocido su potencial patógeno, se relacionan en mayor medida con procesos de colonización o posibles contaminaciones.
4. En este estudio se confirma que la técnica de epidemiología molecular basada en la reacción en cadena de la polimerasa RAPD, es útil en la identificación del fenómeno de policlonalidad dentro del grupo de las micobacterias de crecimiento rápido, siempre que se sigan estrictamente las condiciones indicadas.
5. Dentro de los antibióticos testados, las cepas monoclonales presentan una mayor tasa de resistencia a ciprofloxacino y una tendencia a mostrar valores de CMI mayores a los antibióticos que el conjunto de los clones de los aislamientos policlonales. Esta mayor resistencia puede tener repercusión en el trascurso de la infección.
6. El morfotipo de la colonia, así como la velocidad de crecimiento, no parecen tener relación alguna con el fenómeno de la policlonalidad. La capacidad invasiva se relaciona directamente con el significado clínico, así como con los aislamientos de cepas pertenecientes al grupo abscessus-chelonae.

7. El desarrollo de biopelículas, bajo las condiciones ambientales de este estudio, se relaciona en mayor medida con los aislamientos en los que se da el fenómeno de la policlonalidad.
8. La capacidad de penetración intracelular en fibroblastos se asocia con el carácter patogénico de los aislamientos, entendido como la capacidad de causar infección, pero no con la presencia de policlonalidad.

7. SUMMARY

1. INTRODUCTION

Rapidly growing mycobacteria (RGM) are an ubiquitous group of environmental organisms that can be opportunistic pathogens (71-72, 128). According to the literature the most frequent pathogens are *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium fortuitum* (124). These species are opportunistic pathogens that can cause a wide variety of infections, from pulmonary disease to skin infection or sepsis (37). Other RGM species are less frequently isolated and only in exceptional cases may be considered as the cause of infection (28). As they are considered environmental organisms that can be isolated from water and plumbing systems (31, 53), a standardized criteria based on international clinical guides is needed to establish the clinical significance of these isolations (13).

Polyclonality has been defined as the presence of different genotypes from the same bacterial species in the same sample (94). There are some studies and mathematical models suggesting that the selection of several clones can occur under stressful conditions, such as antimicrobial therapy (95). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis has been used as a technique to determinate genotypic differences, sources of outbreaks and also to make epidemiological researches (96, 98-99). There is a hypothesis, formulated in some studies, explaining that different genotypes of mycobacteria could correspond with their pathogenic phenotypes (103). In this way the determination of the genotypes present in a patient could give important information about the evolution of the infections and how to manage it. The presence of some clones could be a risk factor that needed to be studied in order to perform a proper evaluation of the patient (104).

2. OBJETIVES

The aim of this study is to analyze the presence of polyclonality among strains of RGM isolated from clinical samples, and to establish its frequency, species distribution, relation with clinical significance and phenotypic differences between clones.

Phenotypic characteristics such as colony morphology and growth rate, *in vitro* susceptibility to most frequently antibiotics used in the treatment of infections caused by these microorganisms, the ability to invade cells and the ability to develop biofilms, are studied in order to detect differences between clones and its possible relationship with polyclonality.

3. MATERIALS AND METHODS

Thirty-four clinical isolates (one isolate/patient) from five Spanish hospitals were studied. All hospitals processed the samples for mycobacterial culture using internationally standardized protocols (124). Identification of the isolates was performed by using a PCR-hybridization method (GenoTypeMycobacterium CM/AS System, Hain Lifescience, Nehren, Germany). Up to 20 individual colonies were randomly selected from the original positive cultures and re-isolated onto Middlebrook 7H10 agar. Clinical significance of the isolates was established following international guidelines (13). RAPD analysis was performed based on the protocol described by Zhang *et al.* (172) and using three of the described primers (INS-2, IS986-FP and OPA-2). PuRe Taq Ready-to-go PCR beads (Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, UK) were used. The amplification was conducted in a PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, St Bruno, QC, Canada) as follows: 40 cycles at 94°C for 1 min, 36°C for 1 min and at 72°C for 2 min. To avoid reproducibility problems, all colonies from the same isolate were analyzed together. We

compared patterns using Bioprofile BioGene Software (Vilber-Lourmat, Marne la Vallée, France). Difference among clones was established when two or more high-density bands were different in at least one of the three primers used.

Next phenotypic studies were then performed with one strain from each clone:

- Minimum inhibitory concentration was studied for amikacin, cefoxitin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline and linezolid following the standardized broth microdilution test (241). A difference between clones was considered if MIC was different in two or more dilutions.
- Growth rate, defined as the day when the colony size reached a 1-mm diameter, and colony morphology (smooth or rough) were determinate by streaking 10 µl of a 0.5 McFarland dilution on Middlebrook 7H10 plates and incubated at 30°C in normal atmosphere.
- Presence of *erm* genes was analyzed using consensus primers and PCR protocol described by Nash *et al.* (120). The *erm* gene amplification product of 175bp was detected using Bioprofile BioGene Software (Vilber-Lourmat, Marne la Vallée, France).
- Cell invasiveness was assessed by the fibroblast microcolony assay previously described by Esteban *et al.* (144). After four days, microcolonies of each clone were photographed using 10X objective. Maximum and minimum diameter was measured by Image J Launcher software (National Institute of Health, United States). Finally, the relationship between the maximum and minimum diameter was calculated for each clone.

- Biofilm development capacity was assessed following the procedure described by Esteban *et al.* (165) in 96 well microplates and incubated twelve days. Everyday a well of each clone was stained with fucsina and was photographed using 10X objective. Percentage of covered surface was evaluated by Image J Launcher software (National Institute of Health, United States).

4. RESULTS

From the 34 clinical isolations of RGM, species distribution was 19 *M. abscessus*, 2 *M. chelonae*, 11 *M. fortuitum* and 2 *M. mucogenicum*. There was 23 isolations with clinical significance (19 *M. abscessus*, 2 *M. chelonae* and 2 *M. fortuitum*). In 7 isolations from a respiratory source (20.6%) more than one clone could be detected by RAPD analysis. The mean number of clones was 7.14 clones /isolate (range 3-11). Polyclonality was detected in 1 *M. abscessus* (5.6%), 5 *M. fortuitum* (45.45%) and 1 *M. mucogenicum* (50%) isolates. Species were grouped in abscessus-chelonae group (*M. abscessus* and *M. chelonae*) and fortuitum group (*M. fortuitum* and *M. mucogenicum*). The abscessus-chelonae group had 4.76% polyclonal strains, while the fortuitum group had 46.15% (p 0.007, Fisher's exact test). Ninety-six per cent of clinically significant isolates were found to be monoclonal (p 0.002, Fisher's exact test). Only one of the polyclonal isolates (*M. abscessus*) had clinical relevance.

Antimicrobial susceptibility testing showed the following percentages of resistance among monoclonal isolates: 11% for amikacin, 7.4% for cefoxitin, 25.9% for ciprofloxacin, 11% for clarithromycin, 77.8% for doxycycline and no resistances against linezolid. Antimicrobial susceptibility testing of polyclonal strains showed differences between clones in four isolates. These differences appeared in all of the antimicrobials except linezolid.

There was only one isolate where all but one of the clones was doxycycline-resistant. Among polyclonal isolates, resistance was 4% for amikacin, 4% for ciprofloxacin, 6% for clarithromycin, 80% for doxycycline. There were no ceftiofur-resistant clones detected although 54% had intermediate susceptibility. Comparing the distribution of resistances between monoclonal and polyclonal isolates, the difference for ciprofloxacin was statistically significant ($p = 0.039$, Fisher's exact test) showing higher resistant levels monoclonal isolates.

Growth rate was different in all of the polyclonal samples and varied widely between 3 and 7 days. There was no relationship between species regarding this property. Rough colonies appeared in 67.6% of the clones (61% from the abscessus-chelonae group). Smooth colonies (29.4% of total) were mainly also from the abscessus-chelonae group (70%). One isolate showed mixed morphotypes.

In 7 of the monoclonal samples *erm* genes were detected being 6 of them *M. fortuitum*. The relationship between the presence of *erm* genes and the resistance among clarithromycin was statistically significant ($p = 0.0019$, Fisher's exact test) in this group. This relationship does not occur in polyclonal samples, in which *erm* genes were detected in four of the seven isolates.

Cell invasiveness was studied regarding the relationship between maximum and minimum diameter. When this ratio is one it means that the microcolony is round. Tendency to elongate and therefore invasiveness, was established when the ratio was more than 1.2. The relationship between the RGM's ability to invade cells and the pathogenicity of isolates ($p = 0.029$, Fisher's exact test), reaffirms invasive capacity as a pathogenicity factor. This ability was also linked with abscessus-chelonae group ($p = 0.038$, Fisher's exact test).

Almost half of the isolations studied developed biofilm under study conditions. This ability had a statistically significant association with polyclonality phenomenon (p 0.0348, Fisher's exact test) and also with the fortuitum group (p 0.00919, Fisher's exact test).

5. DISCUSSION

Results obtained in our experience suggest that there may be a tendency towards monoclonality in those species that are usually more pathogenic for humans (*M. abscessus* and *M. fortuitum*), and it seems to be associated with human diseases. Assuming that the main source of mycobacteria would be environmental (55), and that in nature a mix of different clones from the same species could be expected; we hypothesize that all of these clones appear in the first stages of colonization. Later, in some cases, a virulent clone, could prevail and finally infection develops. On the other hand, with potentially less pathogenic species, several clones could coexist without infection. Studies on the possibility of human transmission in cystic fibrosis patients (14) appear to support the previous hypothesis, because long colonization periods can allow pathogenic clone selection.

Monoclonal samples show a tendency to antimicrobial resistance (high levels of MIC). In particular, ciprofloxacin showed a statistically significance tendency to resistance in monoclonal samples, which usually show resistance against quinolones (18). Because it is recommended to base treatments on individual susceptibility testing (112), according to our results, several colonies must be tested to avoid false results that could lead to therapeutic failures.

Rough colonies have been associated with more severe and persistent cases of infection (229). However, we could not affirm that the presence of rough colonies is related to

clinical significance (230). In addition, growth rate does not follow any pattern that could be related to species or group.

Cell invasiveness has been widely described especially for *M. tuberculosis* but also for other species of Mycobacteria (231, 235). In these studies, it has been determinate that the presence of lengthened microcolonies in cell cultures is related to high virulence of the strain. Nevertheless, round microcolonies show that there is no cell invasion. In our study, cell invasiveness seems to be an important pathogenic factor which contributes to virulence because of its relationship with clinical significance.

Biofilm development capacity is an important pathogenic factor and its implication is higher in those infections related to strange objects as prosthesis or catheters (236, 238). On the contrary, our experience suggests that biofilm development is related to colonization or contamination cases. However, as most of bacteria are able to develop biofilms, we could imagine that under other environmental conditions, this RGM could form it. As there is a relationship between biofilm development and polyclonality, microorganisms from environmental sources that reach an anatomic cavity in human body preserve biofilm development capacity and start colonization state.

6. CONCLUSION

Polyclonality seems to be exceptional in clinical significant RGM, but is relatively common among non-signifiacnt isolates. Moreover, those isolates that were clinically significant, apart from being monoclonal, belongs to *M. abscessus* and *M. chelonae* species. On the other hand, polyclonal isolates belongs to fortuitum group species in which is well known its relationship with situations of colonization or the possibility of being a contamination.

This study supports that RPAD analysis is a good tool, under the same conditions described, to investigate the appearance of polyclonality in RGM group. Regarding antimicrobials tested, monoclonal isolates showed higher MIC values for ciprofloxacin and also a tendency for antimicrobial resistance in monoclonal isolates has been detected. This could have effects on the infection outcome.

Growth rate and colony morphology had no relationship with polyclonality phenomenon. Nevertheless, cell invasiveness is directly related with clinical signification and abscessus-chelonae group while biofilm development, under the study conditions, showed strongest relationship with polyclonality isolates.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Lehmann KB NR. Atlas und Grundris der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bakteriologischen Diagnostik. 1^a ed. Munchen 1896.
2. Euzéby J. List of bacterial names with standing in nomenclature: *Mycobacterium*. 2015 [Febrero 2015]; Available from: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>.
3. Zhang DF, Chen X, Zhang XM, Zhi XY, Yao JC, Jiang Y, et al. *Mycobacterium sediminis* sp. nov. and *Mycobacterium arabiense* sp. nov., two rapidly growing members of the genus *Mycobacterium*. Int J Syst Evol Microbiol. 2013 Nov;63(Pt 11):4081-6.
4. Guerin-Faubleee V, Flandrois JP, Pichat C, Boschioli ML, Lamy B. *Mycobacterium bourgelatii* sp. nov., a rapidly growing, non-chromogenic species isolated from the lymph nodes of cattle. Int J Syst Evol Microbiol. 2013 Dec;63(Pt 12):4669-74.
5. Tortoli E, Gitti Z, Klenk HP, Lauria S, Mannino R, Mantegani P, et al. Survey of 150 strains belonging to the *Mycobacterium terrae* complex and description of *Mycobacterium engbaekii* sp. nov., *Mycobacterium heraklionense* sp. nov. and *Mycobacterium longobardum* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2013 Feb;63(Pt 2):401-11.
6. Ramos JP, Campos CE, Caldas PC, Ferreira NV, da Silva MV, Redner P, et al. *Mycobacterium fragae* sp. nov., a non-chromogenic species isolated from human respiratory specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 2013 Jul;63(Pt 7):2583-7.
7. Shojaei H, Daley C, Gitti Z, Hashemi A, Heidarieh P, Moore ER, et al. *Mycobacterium iranicum* sp. nov., a rapidly growing scotochromogenic species isolated from clinical specimens on three different continents. Int J Syst Evol Microbiol. 2013 Apr;63(Pt 4):1383-9.
8. Hannigan GD, Krivogorsky B, Fordice D, Welch JB, Dahl JL. *Mycobacterium minnesotense* sp. nov., a photochromogenic bacterium isolated from sphagnum peat bogs. Int J Syst Evol Microbiol. 2013 Jan;63(Pt 1):124-8.
9. Kim BJ, Hong SH, Yu HK, Park YG, Jeong J, Lee SH, et al. *Mycobacterium parakoreense* sp. nov., a slowly growing non-chromogenic species related to *Mycobacterium*

koreense, isolated from a human clinical specimen. Int J Syst Evol Microbiol. 2013 Jun;63(Pt 6):2301-8.

10. Kim BJ, Math RK, Jeon CO, Yu HK, Park YG, Kook YH. *Mycobacterium yongonense* sp. nov., a slow-growing non-chromogenic species closely related to *Mycobacterium intracellulare*. Int J Syst Evol Microbiol. 2013 Jan;63(Pt 1):192-9.

11. Kim BJ, Hong SH, Kook YH. *Mycobacterium paragordoniae* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species closely related to *Mycobacterium gordonae*. Int J Syst Evol Microbiol. 2014 Jan;64(Pt 1):39-45.

12. Falkinham JO, 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 1996 Apr;9(2):177-215.

13. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007 Feb 15;175(4):367-416.

14. Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, Foweraker J, Roddick I, Inns T, et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. Lancet. 2013 May 4;381(9877):1551-60.

15. Harris KA, Underwood A, Kenna DT, Brooks A, Kavaliunaite E, Kapatai G, et al. Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analysis Do Not Provide Evidence for Cross-transmission of *Mycobacterium abscessus* in a Cohort of Pediatric Cystic Fibrosis Patients. Clin Infect Dis. 2014 Dec 1.

16. Braun E, Sprecher H, Davidson S, Kassis I. Epidemiology and clinical significance of non-tuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens. Int J Tuberc Lung Dis. 2013 Jan;17(1):96-9.

17. McGrath EE, McCabe J, Anderson PB. Guidelines on the diagnosis and treatment of pulmonary non-tuberculous mycobacteria infection. *Int J Clin Pract.* 2008 Dec;62(12):1947-55.
18. Esteban J, Garcia-Pedrazuela M, Munoz-Egea MC, Alcaide F. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. *Expert Opin Pharmacother.* 2012 May;13(7):967-86.
19. Piersimoni C, Scarparo C. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerg Infect Dis.* 2009 Sep;15(9):1351-8; quiz 544.
20. Goodfellow M MJ. Mycobacteria: I Basic aspects. In: Gangadharam PRJ JP, editors., editor. *Taxonomy of Mycobacteria.* New York: Chapman & Hall; 1998. p. 1-71.
21. De Groote MA, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis.* 2006 Jun 15;42(12):1756-63.
22. Munoz-Egea MC, Garcia-Pedrazuela M, Mahillo I, Garcia MJ, Esteban J. Autofluorescence as a tool for structural analysis of biofilms formed by nonpigmented rapidly growing mycobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Feb;79(3):1065-7.
23. Carson LA, Cusick LB, Bland LA, Favero MS. Efficacy of chemical dosing methods for isolating nontuberculous mycobacteria from water supplies of dialysis centers. *Appl Environ Microbiol.* 1988 Jul;54(7):1756-60.
24. Carson LA, Petersen NJ, Favero MS, Agüero SM. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Appl Environ Microbiol.* 1978 Dec;36(6):839-46.
25. Selvaraju SB, Khan IU, Yadav JS. Biocidal activity of formaldehyde and nonformaldehyde biocides toward *Mycobacterium immunogenum* and *Pseudomonas fluorescens* in pure and mixed suspensions in synthetic metalworking fluid and saline. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jan;71(1):542-6.

26. Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 2002 Oct;15(4):716-46.
27. van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. Semin Respir Crit Care Med. 2013 Feb;34(1):103-9.
28. Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Fernandez AI, Fernandez-Roblas R, Gadea I. Epidemiology of infections due to nonpigmented rapidly growing mycobacteria diagnosed in an urban area. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008 Oct;27(10):951-7.
29. Asiimwe BB, Asiimwe J, Kallenius G, Ashaba FK, Ghebremichael S, Joloba M, et al. Molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle carcasses at a city slaughterhouse in Uganda. Vet Rec. 2009 May 23;164(21):655-8.
30. Muwonge A, Kankya C, Godfroid J, Djonne B, Opuda-Asibo J, Biffa D, et al. Prevalence and associated risk factors of mycobacterial infections in slaughter pigs from Mubende district in Uganda. Trop Anim Health Prod. 2010 Jun;42(5):905-13.
31. Falkinham JO, 3rd. Ecology of nontuberculous mycobacteria--where do human infections come from? Semin Respir Crit Care Med. 2013 Feb;34(1):95-102.
32. Wallace RJ, Jr., Brown BA, Griffith DE. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. Annu Rev Microbiol. 1998;52:453-90.
33. van Ingen J, Boeree MJ, Dekhuijzen PN, van Soolingen D. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. Clin Microbiol Infect. 2009 Oct;15(10):888-93.
34. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. This official statement of the American Thoracic Society was approved by the Board of Directors, March 1997. Medical Section of the American Lung Association. Am J Respir Crit Care Med. 1997 Aug;156(2 Pt 2):S1-25.

35. Alcaide Fernandez de Vega F. [New methods for mycobacteria identification]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006 Oct;24 Suppl 1:53-7.
36. van Ingen J, Bendien SA, de Lange WC, Hoefsloot W, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, et al. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax*. 2009 Jun;64(6):502-6.
37. Garcia-Martos P, Garcia-Agudo L. [Infections due to rapidly growing mycobacteria]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012 Apr;30(4):192-200.
38. Butler WR, Guthertz LS. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Oct;14(4):704-26, table of contents.
39. Forbes BA, Banaiee N, Brown-Elliott BA, Della Latta P, Elliott LB, Hall GS, et al. Laboratory detection and identification of mycobacteria; approved guideline M48-A. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, USA.: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
40. Behr MA, Falkinham JO, 3rd. Molecular epidemiology of nontuberculous mycobacteria. *Future Microbiol*. 2009 Oct;4(8):1009-20.
41. Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL, Roberts GD. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol*. 2003 Apr;41(4):1447-53.
42. Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, Varnerot A, Vincent V, Berche P, et al. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 1999 Mar;37(3):852-7.
43. Adekambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 2003 Dec;41(12):5699-708.

44. Kothavade RJ, Dhurat RS, Mishra SN, Kothavade UR. Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by rapidly growing mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 Feb;32(2):161-88.
45. Wang HY, Kim H, Kim S, Bang H, Kim DK, Lee H. Evaluation of PCR-reverse blot hybridization assay for the differentiation and identification of *Mycobacterium* species in liquid cultures. *J Appl Microbiol*. 2015 Jan;118(1):142-51.
46. Quinlan P, Phelan E, Doyle M. Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of mycobacteria from MBBacT ALERT 3D liquid cultures and Lowenstein-Jensen (LJ) solid cultures. *J Clin Pathol*. 2015 Mar;68(3):229-35.
47. Amlerova J, Studentova V, Hrabak J. [Identification of *Mycobacterium spp.* isolates using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2014 Sep;63(3):196-9.
48. Lin SY, Desmond EP. Molecular diagnosis of tuberculosis and drug resistance. *Clin Lab Med*. 2014 Jun;34(2):297-314.
49. Srilohasin P, Chaiprasert A, Tokunaga K, Nao N, Prammananan T. Novel DNA chip based on a modified DigiTag2 assay for high-throughput species identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol*. 2014 Jun;52(6):1962-8.
50. Dubrou S, Konjek J, Macheras E, Welte B, Guidicelli L, Chignon E, et al. Diversity, community composition, and dynamics of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria in an urban tap water production and distribution system. *Appl Environ Microbiol*. 2013 Sep;79(18):5498-508.

51. Kankya C, Muwonge A, Djonje B, Munyeme M, Opuda-Asibo J, Skjerve E, et al. Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: public health significance. *BMC Public Health*. 2011;11:320.
52. Chilima BZ, Clark IM, Floyd S, Fine PE, Hirsch PR. Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District, northern Malawi. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Apr;72(4):2343-50.
53. Hilborn ED, Covert TC, Yakus MA, Harris SI, Donnelly SF, Rice EW, et al. Persistence of nontuberculous mycobacteria in a drinking water system after addition of filtration treatment. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Sep;72(9):5864-9.
54. Wallace RJ, Jr., Musser JM, Hull SI, Silcox VA, Steele LC, Forrester GD, et al. Diversity and sources of rapidly growing mycobacteria associated with infections following cardiac surgery. *J Infect Dis*. 1989 Apr;159(4):708-16.
55. Baird SF, Taori SK, Dave J, Willocks LJ, Roddie H, Hanson M. Cluster of non-tuberculous mycobacteremia associated with water supply in a haemato-oncology unit. *J Hosp Infect*. 2011 Dec;79(4):339-43.
56. Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC, Swings J, Portaels F. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev*. 2005 Nov;29(5):911-34.
57. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*. 1999 Jun;37(6):1661-9.
58. van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev*. 1994 Apr;7(2):174-84.
59. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis*. 1993 Aug;17(2):153-62; quiz 63-4.

60. Hector JS, Pang Y, Mazurek GH, Zhang Y, Brown BA, Wallace RJ, Jr. Large restriction fragment patterns of genomic *Mycobacterium fortuitum* DNA as strain-specific markers and their use in epidemiologic investigation of four nosocomial outbreaks. J Clin Microbiol. 1992 May;30(5):1250-5.
61. Burns DN, Wallace RJ, Jr., Schultz ME, Zhang YS, Zubairi SQ, Pang YJ, et al. Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with *Mycobacterium fortuitum*: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. Am Rev Respir Dis. 1991 Nov;144(5):1153-9.
62. Lai KK, Brown BA, Westerling JA, Fontecchio SA, Zhang Y, Wallace RJ, Jr. Long-term laboratory contamination by *Mycobacterium abscessus* resulting in two pseudo-outbreaks: recognition with use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction. Clin Infect Dis. 1998 Jul;27(1):169-75.
63. Ashford DA, Kellerman S, Yakrus M, Brim S, Good RC, Finelli L, et al. Pseudo-outbreak of septicemia due to rapidly growing mycobacteria associated with extrinsic contamination of culture supplement. J Clin Microbiol. 1997 Aug;35(8):2040-2.
64. Esteban J, Fernandez Roblas R, Garcia Cia JI, Zamora N, Ortiz A. Clinical significance and epidemiology of non-pigmented rapidly growing mycobacteria in a university hospital. J Infect. 2007 Feb;54(2):135-45.
65. Legrand E, Radegonde N, Goh KS, Rastogi N. A pulsed-field gel electrophoresis study of *Mycobacterium fortuitum* in a Caribbean setting underlines high genetic diversity of the strains and excludes nosocomial outbreaks. Int J Med Microbiol. 2002 Jun;292(1):51-7.
66. Petrini B. Non-tuberculous mycobacterial infections. Scand J Infect Dis. 2006;38(4):246-55.
67. Weiss CH, Glassroth J. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. Expert Rev Respir Med. 2012 Dec;6(6):597-612; quiz 3.

68. Gunaydin M, Yanik K, Eroglu C, Sanic A, Ceyhan I, Erturan Z, et al. Distribution of Nontuberculous Mycobacteria strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013 Nov 21;12(1):33.
69. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Angeby K, Bauriaud R, Berner P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J*. 2013 Dec;42(6):1604-13.
70. Brown-Elliott BA, Griffith DE, Wallace RJ, Jr. Newly described or emerging human species of nontuberculous mycobacteria. *Infect Dis Clin North Am*. 2002 Mar;16(1):187-220.
71. de Mello KG, Mello FC, Borga L, Rolla V, Duarte RS, Sampaio EP, et al. Clinical and therapeutic features of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Brazil, 1993-2011. *Emerg Infect Dis*. 2013 Mar;19(3):393-9.
72. Yu JR, Heo ST, Lee KH, Kim J, Sung JK, Kim YR, et al. Skin and Soft Tissue Infection due to Rapidly Growing Mycobacteria: Case Series and Literature Review. *Infect Chemother*. 2013 Mar;45(1):85-93.
73. Arend SM, van Soolingen D, Ottenhoff TH. Diagnosis and treatment of lung infection with nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Pulm Med*. 2009 May;15(3):201-8.
74. Williams MM, Chen TH, Keane T, Toney N, Toney S, Armbruster CR, et al. Point-of-use membrane filtration and hyperchlorination to prevent patient exposure to rapidly growing mycobacteria in the potable water supply of a skilled nursing facility. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011 Sep;32(9):837-44.
75. Galmes-Truyols A, Gimenez-Duran J, Bosch-Isabel C, Nicolau-Riutort A, Vanrell-Berga J, Portell-Arbona M, et al. An outbreak of cutaneous infection due to *Mycobacterium abscessus* associated to mesotherapy. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Aug-Sep;29(7):510-4.

76. Han XY, De I, Jacobson KL. Rapidly growing mycobacteria: clinical and microbiologic studies of 115 cases. *Am J Clin Pathol*. 2007 Oct;128(4):612-21.
77. Hofling-Lima AL, de Freitas D, Sampaio JL, Leao SC, Contarini P. In vitro activity of fluoroquinolones against *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae* causing infectious keratitis after LASIK in Brazil. *Cornea*. 2005 Aug;24(6):730-4.
78. Murillo J, Torres J, Bofill L, Rios-Fabra A, Irausquin E, Isturiz R, et al. Skin and wound infection by rapidly growing mycobacteria: an unexpected complication of liposuction and liposculpture. The Venezuelan Collaborative Infectious and Tropical Diseases Study Group. *Arch Dermatol*. 2000 Nov;136(11):1347-52.
79. Renaud CJ, Subramanian S, Tambyah PA, Lee EJ. The clinical course of rapidly growing nontuberculous mycobacterial peritoneal dialysis infections in Asians: A case series and literature review. *Nephrology (Carlton)*. 2011 Feb;16(2):174-9.
80. Sugimoto H, Ito M, Hatano M, Nakanishi Y, Maruyama Y, Yoshizaki T. A case of chronic otitis media caused by *Mycobacterium abscessus*. *Auris Nasus Larynx*. 2010 Oct;37(5):636-9.
81. Tang P, Walsh S, Murray C, Alterman C, Varia M, Broukhanski G, et al. Outbreak of acupuncture-associated cutaneous *Mycobacterium abscessus* infections. *J Cutan Med Surg*. 2006 Jul-Aug;10(4):166-9.
82. Duan HF, Chu NH, Wang QF, Wang J, Huang HR, Liang Q. [*Mycobacterium abscessus* group lung disease: case reports and review of the literature]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2013 Sep;36(9):671-4.
83. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Jr., Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, et al. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Mar 15;167(6):828-34.

84. Petrini B. *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. APMIS. 2006 May;114(5):319-28.
85. Biggs HM, Chudgar SM, Pfeiffer CD, Rice KR, Zaas AK, Wolfe CR. Disseminated *Mycobacterium immunogenum* infection presenting with septic shock and skin lesions in a renal transplant recipient. Transpl Infect Dis. 2012 Aug;14(4):415-21.
86. Girgis DO, Karp CL, Miller D. Ocular infections caused by non-tuberculous mycobacteria: update on epidemiology and management. Clin Experiment Ophthalmol. 2012 Jul;40(5):467-75.
87. Jain S, Singh S, Sankar MM, Saha R, Rangaraju RR, Chugh TD. Catheter-related bacteremia due to *M. chelonae* in an immunocompromised patient: an emerging nosocomial pathogen. Indian J Med Microbiol. 2012 Oct-Dec;30(4):489-91.
88. Regnier S, Cambau E, Meningaud JP, Guihot A, Deforges L, Carbonne A, et al. Clinical management of rapidly growing mycobacterial cutaneous infections in patients after mesotherapy. Clin Infect Dis. 2009 Nov 1;49(9):1358-64.
89. Bosio S, Leekha S, Gamb SI, Wright AJ, Terrell CL, Miller DV. *Mycobacterium fortuitum* prosthetic valve endocarditis: a case for the pathogenetic role of biofilms. Cardiovasc Pathol. 2012 Jul-Aug;21(4):361-4.
90. Hemmersbach-Miller M, Cardenes-Santana MA, Conde-Martel A, Bolanos-Guerra JA, Campos-Herrero MI. Cardiac device infections due to *Mycobacterium fortuitum*. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2005 May;16(3):183-5.
91. Quinones C, Ramalle-Gomara E, Perucha M, Lezaun ME, Fernandez-Vilarino E, Garcia-Morras P, et al. An outbreak of *Mycobacterium fortuitum* cutaneous infection associated with mesotherapy. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2010 May;24(5):604-6.
92. Ranganathan D, Fassett R, John GT. *Mycobacterium fortuitum* peritonitis in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2013 Sep;24(5):1003-4.

93. Winthrop KL, Albridge K, South D, Albrecht P, Abrams M, Samuel MC, et al. The clinical management and outcome of nail salon-acquired *Mycobacterium fortuitum* skin infection. Clin Infect Dis. 2004 Jan 1;38(1):38-44.
94. van Saene HK, Taylor N, Damjanovic V, Sarginson RE. Microbial gut overgrowth guarantees increased spontaneous mutation leading to polyclonality and antibiotic resistance in the critically ill. Curr Drug Targets. 2008 May;9(5):419-21.
95. Blazquez J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. Clin Infect Dis. 2003 Nov 1;37(9):1201-9.
96. Livni G, Yaniv I, Samra Z, Kaufman L, Solter E, Ashkenazi S, et al. Outbreak of *Mycobacterium mucogenicum* bacteraemia due to contaminated water supply in a paediatric haematology-oncology department. J Hosp Infect. 2008 Nov;70(3):253-8.
97. Ortiz A, Esteban J, Zamora N. Molecular identification by random amplified polymorphic DNA analysis of a pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* due to cross-contamination of clinical samples. J Med Microbiol. 2007 Jun;56(Pt 6):871-2.
98. Singh JP, Verma R, Chaudhuri P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains in India. J Vet Sci. 2006 Jun;7(2):181-7.
99. Esteban J, Fernandez-Roblas R, Ortiz A, Garcia-Cia JI. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae*: usefulness of randomly amplified polymorphic DNA analysis to assess the clonality of the isolates. Clin Microbiol Infect. 2006 Jul;12(7):677-9.
100. Barbara A. Brown-Elliott and Richard J. Wallace J. Mycobacterium: Clinical and Laboratory Characteristics of Rapidly Growing Mycobacteria. 10^a ed. Versalovic J CK, Funke G, Jorgensen J H, Landry M L, Warnock D W., editor. Washington. DC: ASM; 2011.

101. Riley LW. Laboratory methods used for strain typing of pathogens: PCR-based strain-typing methods. *Molecular epidemiology of infectious diseases: principles and practices*. Washington: ASM Press; 2004. p. 71-2.
102. Esteban J, Zamora N, Ortiz A. Use of molecular techniques for epidemiological typing of rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Sep;12(9):943-4; author reply 4.
103. Shin SJ, Choi GE, Cho SN, Woo SY, Jeong BH, Jeon K, et al. Mycobacterial genotypes are associated with clinical manifestation and progression of lung disease caused by *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense*. *Clin Infect Dis*. 2013 Jul;57(1):32-9.
104. Giraud A, Matic I, Radman M, Fons M, Taddei F. Mutator bacteria as a risk factor in treatment of infectious diseases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Mar;46(3):863-5.
105. Woods GL, B. A. Brown-Elliott, E. P. Desmond, G. S. Hall, L. Heifets, G. E. Pfyffer, J. C. Ridderhof, R. J. Wallace, Jr., N. G. Warren, and F. G. Witebsky. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. Document M24-A. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA. 2003.
106. Woods GL, Bergmann JS, Witebsky FG, Fahle GA, Wanger A, Boulet B, et al. Multisite reproducibility of results obtained by the broth microdilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. *J Clin Microbiol*. 1999 Jun;37(6):1676-82.
107. Woods GL. Susceptibility testing for mycobacteria. *Clin Infect Dis*. 2000 Nov;31(5):1209-15.
108. Alcaide F, Esteban J, González J. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Micobacterias. In: Cercenado E, Cantón R, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica*: SEIMC; 2005.

109. Woods GL, Bergmann JS, Witebsky FG, Fahle GA, Boulet B, Plaunt M, et al. Multisite reproducibility of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium fortuitum*. J Clin Microbiol. 2000 Feb;38(2):656-61.
110. Esteban J, Gadea I, Torres MV, Cabria F, Rollan E, Santos-O'Connor FG, et al. A comparison between disk diffusion and microdilution for susceptibility testing of *Mycobacterium fortuitum complex*. J Chemother. 2002 Dec;14(6):547-53.
111. Nessar R, Cambau E, Reytrat JM, Murray A, Gicquel B. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. J Antimicrob Chemother. 2012 Apr;67(4):810-8.
112. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ, Jr. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 2012 Jul;25(3):545-82.
113. Bastian S, Veziris N, Roux AL, Brossier F, Gaillard JL, Jarlier V, et al. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by erm(41) and rrl sequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Feb;55(2):775-81.
114. Ainsa JA, Blokpoel MC, Otal I, Young DB, De Smet KA, Martin C. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 1998 Nov;180(22):5836-43.
115. Wallace RJ, Jr., Meier A, Brown BA, Zhang Y, Sander P, Onyi GO, et al. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. Antimicrob Agents Chemother. 1996 Jul;40(7):1676-81.
116. Guillemin I, Jarlier V, Cambau E. Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Aug;42(8):2084-8.

117. Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Ortiz A, Kinnari TJ, Bodas Sanchez A, Gadea I, et al. Detection of *lfrA* and *tap* efflux pump genes among clinical isolates of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Nov;34(5):454-6.
118. Nash KA, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Apr;53(4):1367-76.
119. Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Garcia-Almeida D, Bodas-Sanchez A, Gadea I, Fernandez-Roblas R. Prevalence of *erm* methylase genes in clinical isolates of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Oct;15(10):919-23.
120. Nash KA, Andini N, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Oct;50(10):3476-8.
121. Maurer FP, Castelberg C, Quiblier C, Bottger EC, Somoskovi A. *Erm(41)*-dependent inducible resistance to azithromycin and clarithromycin in clinical isolates of *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Feb 4.
122. Griffith DE, Brown-Elliott BA, Langsjoen B, Zhang Y, Pan X, Girard W, et al. Clinical and molecular analysis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium complex* lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Oct 15;174(8):928-34.
123. Nash KA, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Feb;55(2):170-7.
124. Brown-Elliott BA, Wallace RJJ. *Mycobacterium: Clinical and Laboratory Characteristics of Rapidly Growing Mycobacteria*. 10^a ed. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. Washington. DC: ASM; 2011.
125. Brown-Elliott BA WRJ. *Rapidly Growing Mycobacteria*. 6th edition ed. D. S, editor. Washington, D.C.: ASM Press; 2011.

126. Wallace RJ, Jr., Swenson JM, Silcox VA, Bullen MG. Treatment of nonpulmonary infections due to *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* on the basis of in vitro susceptibilities. J Infect Dis. 1985 Sep;152(3):500-14.
127. Yang SC, Hsueh PR, Lai HC, Teng LJ, Huang LM, Chen JM, et al. High prevalence of antimicrobial resistance in rapidly growing mycobacteria in Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Jun;47(6):1958-62.
128. El Helou G, Hachem R, Viola GM, El Zakhem A, Chaftari AM, Jiang Y, et al. Management of rapidly growing mycobacterial bacteremia in cancer patients. Clin Infect Dis. 2013 Mar;56(6):843-6.
129. Wallace RJ, Jr., Brown BA, Onyi GO. Skin, soft tissue, and bone infections due to *Mycobacterium chelonae*: importance of prior corticosteroid therapy, frequency of disseminated infections, and resistance to oral antimicrobials other than clarithromycin. J Infect Dis. 1992 Aug;166(2):405-12.
130. Jiang SH, Roberts DM, Clayton PA, Jardine M. Non-tuberculous mycobacterial PD peritonitis in Australia. Int Urol Nephrol. 2013 Oct;45(5):1423-8.
131. Ward MS, Lam KV, Cannell PK, Herrmann RP. Mycobacterial central venous catheter tunnel infection: a difficult problem. Bone Marrow Transplant. 1999 Aug;24(3):325-9.
132. Griffith DE. The talking *Mycobacterium abscessus* blues. Clin Infect Dis. 2011 Mar 1;52(5):572-4.
133. Uyan ZS, Ersu R, Oktem S, Cakir E, Koksalan OK, Karadag B, et al. *Mycobacterium abscessus* infection in a cystic fibrosis patient: a difficult to treat infection. Int J Tuberc Lung Dis. 2010 Feb;14(2):250-1.

134. Jarand J, Levin A, Zhang L, Huitt G, Mitchell JD, Daley CL. Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. Clin Infect Dis. 2011 Mar 1;52(5):565-71.
135. Ramsugit S, Pillay M. Mycobacterium tuberculosis Pili promote adhesion to and invasion of THP-1 macrophages. Jpn J Infect Dis. 2014;67(6):476-8.
136. Chen F, Zhou J, Huang YH, Huang FY, Liu Q, Fang Z, et al. Function of ssDNA aptamer and aptamer pool against *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model. Mol Med Rep. 2013 Feb;7(2):669-73.
137. Rey-Jurado E, Tundo G, Soy D, Gonzalez-Martin J. Activity and interactions of levofloxacin, linezolid, ethambutol and amikacin in three-drug combinations against *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a human macrophage model. Int J Antimicrob Agents. 2013 Dec;42(6):524-30.
138. Chen F, Zhang X, Zhou J, Liu S, Liu J. Aptamer inhibits *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) invasion of macrophage. Mol Biol Rep. 2012 Mar;39(3):2157-62.
139. Parti RP, Srivastava S, Gachhui R, Srivastava KK, Srivastava R. Murine infection model for *Mycobacterium fortuitum*. Microbes Infect. 2005 Mar;7(3):349-55.
140. Higuchi K, Harada N, Yamada H, Kobayashi K, Takeda M. The invasion of *Mycobacterium tuberculosis* into non-phagocytic cells. Kekkaku. 2000 Nov;75(11):649-59.
141. Guirado E, Mbawuike U, Keiser TL, Arcos J, Azad AK, Wang SH, et al. Characterization of host and microbial determinants in individuals with latent tuberculosis infection using a human granuloma model. MBio. 2015;6(1):e02537-14.
142. Byrd TF, Green GM, Fowlston SE, Lyons CR. Differential growth characteristics and streptomycin susceptibility of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in a novel fibroblast-mycobacterium microcolony assay. Infect Immun. 1998 Nov;66(11):5132-9.

143. Byrd TF, Lyons CR. Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infect Immun*. 1999 Sep;67(9):4700-7.
144. Esteban J, Gadea I, Zamora N, Ortiz A, Fernandez-Roblas R. [Assessment of the invasiveness of rapidly-growing nonpigmented mycobacteria with the fibroblast microcolony assay]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006 Nov;24(9):551-5.
145. Pang L, Tian X, Pan W, Xie J. Structure and function of mycobacterium glycopeptidolipids from comparative genomics perspective. *J Cell Biochem*. 2013 Aug;114(8):1705-13.
146. Yoon JH, Kim EC, Kim JS, Song EY, Yi J, Shin S. Possession of the macrophage-induced gene by isolates of the *Mycobacterium avium complex* is not associated with significant clinical disease. *J Med Microbiol*. 2009 Feb;58(Pt 2):256-60.
147. Udou T. Extracellular hemolytic activity in rapidly growing mycobacteria. *Can J Microbiol*. 1994 Apr;40(4):318-21.
148. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:711-45.
149. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79.
150. Zelter N, Hamilton M, Goeres D, Heersink J. Development of a standardized antibiofilm test. *Methods Enzymol*. 2001;337:363-76.
151. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):95-108.
152. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol*. 2005 Jan;13(1):7-10.

153. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S, Hoiby N, Moser C, Costerton JW, et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Jul;65(2):127-45.
154. Simoes LC, Simoes M, Vieira MJ. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Oct;73(19):6192-200.
155. Chow JY, Wu L, Yew WS. Directed evolution of a quorum-quenching lactonase from *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* K-10 in the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*. 2009 May 26;48(20):4344-53.
156. Garg N, Manchanda G, Kumar A. Bacterial quorum sensing: circuits and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013 Nov 27.
157. Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Aug(437):7-11.
158. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):167-93.
159. Mah TF. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol*. 2012 Sep;7(9):1061-72.
160. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Aug(437):41-7.
161. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001 Jan;9(1):34-9.
162. Zhang L, Mah TF. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J Bacteriol*. 2008 Jul;190(13):4447-52.
163. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, et al. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Jun;45(6):1761-70.

164. Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Mechanisms of Immune Evasion. *Adv Appl Microbiol.* 2014;86:1-40.
165. Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Kinnari TJ, Ayala G, Fernandez-Roblas R, Gadea I. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiol.* 2008;8:184.
166. Martin-de-Hijas NZ, Garcia-Almeida D, Ayala G, Fernandez-Roblas R, Gadea I, Celdran A, et al. Biofilm development by clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Oct;15(10):931-6.
167. Martin-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J, Thomsen VO, Curcio M, Fauville-Dufaux M, et al. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004 Oct;8(10):1186-93.
168. Ortiz-Perez A, Martin-de-Hijas N, Alonso-Rodriguez N, Molina-Manso D, Fernandez-Roblas R, Esteban J. Importance of antibiotic penetration in the antimicrobial resistance of biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria against amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011 Feb;29(2):79-84.
169. Greendyke R, Byrd TF. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jun;52(6):2019-26.
170. Teng R, Dick T. Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 Oct 24;227(2):171-4.
171. Riley LW. Principles and Approaches. *Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Principles and Practices.* Washington: ASM Press; 2004. p. 3.

172. Zhang Y, Rajagopalan M, Brown BA, Wallace RJ, Jr. Randomly amplified polymorphic DNA PCR for comparison of *Mycobacterium abscessus* strains from nosocomial outbreaks. J Clin Microbiol. 1997 Dec;35(12):3132-9.
173. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. Am Rev Respir Dis. 1979 Jan;119(1):107-59.
174. Wallace RJ, Jr., Swenson JM, Silcox VA, Good RC, Tschen JA, Stone MS. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. Rev Infect Dis. 1983 Jul-Aug;5(4):657-79.
175. Esteban J, Fernandez Roblas R, Soriano F. [Rapidly growing mycobacteria in human pathology]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2000 Jun-Jul;18(6):279-86.
176. Alcaide F, Esteban J. [Cutaneous and soft skin infections due to non-tuberculous mycobacteria]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010 Jan;28 Suppl 1:46-50.
177. Al-Anazi KA, Al-Jasser AM, Al-Anazi WK. Infections caused by non-tuberculous mycobacteria in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. Front Oncol. 2014;4:311.
178. Fowler J, Mahlen SD. Localized cutaneous infections in immunocompetent individuals due to rapidly growing mycobacteria. Arch Pathol Lab Med. 2014 Aug;138(8):1106-9.
179. Catherinot E, Roux AL, Macheras E, Hubert D, Matmar M, Dannhoffer L, et al. Acute respiratory failure involving an R variant of *Mycobacterium abscessus*. J Clin Microbiol. 2009 Jan;47(1):271-4.
180. Koh WJ, Stout JE, Yew WW. Advances in the management of pulmonary disease due to *Mycobacterium abscessus complex*. Int J Tuberc Lung Dis. 2014 Oct;18(10):1141-8.
181. Kim RD, Greenberg DE, Ehrmantraut ME, Guide SV, Ding L, Shea Y, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease: prospective study of a distinct preexisting syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 2008 Nov 15;178(10):1066-74.

182. Roux AL, Catherinot E, Ripoll F, Soismier N, Macheras E, Ravilly S, et al. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in france. J Clin Microbiol. 2009 Dec;47(12):4124-8.
183. Gilljam M, Schersten H, Silverborn M, Jonsson B, Ericsson Hollsing A. Lung transplantation in patients with cystic fibrosis and *Mycobacterium abscessus* infection. J Cyst Fibros. 2010 Jul;9(4):272-6.
184. Luong ML, Morrissey O, Husain S. Assessment of infection risks prior to lung transplantation. Curr Opin Infect Dis. 2010 Dec;23(6):578-83.
185. Furuya EY, Paez A, Srinivasan A, Cooksey R, Augenbraun M, Baron M, et al. Outbreak of *Mycobacterium abscessus* wound infections among "lipotourists" from the United States who underwent abdominoplasty in the Dominican Republic. Clin Infect Dis. 2008 Apr 15;46(8):1181-8.
186. Garcia-Pedrazuela M, Frutos JM, Munoz-Egea MC, Alcaide F, Tortola T, Vitoria A, et al. Polyclonality among clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria: phenotypic and genotypic differences and their potential implications. Clin Microbiol Infect. 2014 Dec 11.
187. Jang MA, Koh WJ, Huh HJ, Kim SY, Jeon K, Ki CS, et al. Distribution of nontuberculous mycobacteria by multigene sequence-based typing and clinical significance of isolated strains. J Clin Microbiol. 2014 Apr;52(4):1207-12.
188. Aksamit TR, Philley JV, Griffith DE. Nontuberculous mycobacterial (NTM) lung disease: the top ten essentials. Respir Med. 2014 Mar;108(3):417-25.
189. Mougari F, Raskine L, Ferroni A, Marcon E, Sermet-Gaudelus I, Veziris N, et al. Clonal relationship and differentiation among *Mycobacterium abscessus* isolates as determined using the semiautomated repetitive extragenic palindromic sequence PCR-based DiversiLab system. J Clin Microbiol. 2014 Jun;52(6):1969-77.

190. Aitken ML, Limaye A, Pottinger P, Whimbey E, Goss CH, Tonelli MR, et al. Respiratory outbreak of *Mycobacterium abscessus* subspecies massiliense in a lung transplant and cystic fibrosis center. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Jan 15;185(2):231-2.
191. Zhuo FL, Sun ZG, Li CY, Liu ZH, Cai L, Zhou C, et al. Clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* in Guangzhou area most possibly from the environmental infection showed variable susceptibility. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(10):1878-83.
192. Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr., Tichindelean C, Sarria JC, McNulty S, Vasireddy R, et al. Five-year outbreak of community- and hospital-acquired *Mycobacterium porcinum* infections related to public water supplies. *J Clin Microbiol*. 2011 Dec;49(12):4231-8.
193. Thomson R, Tolson C, Sidjabat H, Huygens F, Hargreaves M. *Mycobacterium abscessus* isolated from municipal water - a potential source of human infection. *BMC Infect Dis*. 2013;13:241.
194. Leung JM, Olivier KN. Nontuberculous mycobacteria: the changing epidemiology and treatment challenges in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2013 Nov;19(6):662-9.
195. Arbeit RD, Slutsky A, Barber TW, Maslow JN, Niemczyk S, Falkinham JO, 3rd, et al. Genetic diversity among strains of *Mycobacterium avium* causing monoclonal and polyclonal bacteremia in patients with AIDS. *J Infect Dis*. 1993 Jun;167(6):1384-90.
196. Santos-Sanches I, Chambel L, Tenreiro R. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): application in population structure studies of bovine mastitis-causing streptococci. *Methods Mol Biol*. 2015;1247:323-34.
197. Goering RV, Fey PD. Pulsed field gel electrophoresis of *Staphylococcus epidermidis*. *Methods Mol Biol*. 2014;1106:55-60.
198. De Zoysa A, Hawkey P, Charlett A, Efstratiou A. Comparison of four molecular typing methods for characterization of *Corynebacterium diphtheriae* and determination of transcontinental spread of *C. diphtheriae* based on BstEII rRNA gene profiles. *J Clin Microbiol*. 2008 Nov;46(11):3626-35.

199. Gori A, Espinasse F, Deplano A, Nonhoff C, Nicolas MH, Struelens MJ. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified DNA polymorphism analysis for typing extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol. 1996 Oct;34(10):2448-53.
200. Koeleman JG, Stoof J, Biesmans DJ, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 1998 Sep;36(9):2522-9.
201. Romalde JL, Castro D, Magarinos B, Lopez-Cortes L, Borrego JJ. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Vibrio tapetis*. Syst Appl Microbiol. 2002 Dec;25(4):544-50.
202. Skibsted U, Baggesen DL, Dessau R, Lisby G. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and phage-typing in the analysis of a hospital outbreak of *Salmonella enteritidis*. J Hosp Infect. 1998 Mar;38(3):207-16.
203. Jeon SM, Lim NR, Kwon SJ, Shim TS, Park MS, Kim BJ, et al. Analysis of species and intra-species associations between the *Mycobacterium abscessus complex* strains using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multi-locus sequence typing (MLST). J Microbiol Methods. 2014 Sep;104:19-25.
204. Fernandez-Cuenca F. [Applications of PCR techniques for molecular epidemiology of infectious diseases]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004 Jun-Jul;22(6):355-60.
205. Lasker BA. Evaluation of performance of four genotypic methods for studying the genetic epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol. 2002 Aug;40(8):2886-92.

206. Vila J, Marcos MA, Jimenez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. J Med Microbiol. 1996 Jun;44(6):482-9.
207. Jonas D, Meyer HG, Matthes P, Hartung D, Jahn B, Daschner FD, et al. Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of Legionnaires' disease in hospitals. J Clin Microbiol. 2000 Jun;38(6):2284-91.
208. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 1991 Dec 25;19(24):6823-31.
209. Stern MJ, Ames GF, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. Cell. 1984 Jul;37(3):1015-26.
210. Woods CR, Jr., Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Analysis of relationships among isolates of *Citrobacter diversus* by using DNA fingerprints generated by repetitive sequence-based primers in the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992 Nov;30(11):2921-9.
211. Deplano A, Schuermans A, Van Eldere J, Witte W, Meugnier H, Etienne J, et al. Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. The European Study Group on Epidemiological Markers of the ESCMID. J Clin Microbiol. 2000 Oct;38(10):3527-33.
212. Graser Y, Klare I, Halle E, Gantenberg R, Buchholz P, Jacobi HD, et al. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. J Clin Microbiol. 1993 Sep;31(9):2417-20.
213. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 1995 Nov 11;23(21):4407-14.

214. Savelkoul PH, Aarts HJ, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, et al. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. J Clin Microbiol. 1999 Oct;37(10):3083-91.
215. Fitzgerald JR, Musser JM. Evolutionary genomics of pathogenic bacteria. Trends Microbiol. 2001 Nov;9(11):547-53.
216. Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. Nature. 2000 Jun 15;405(6788):827-36.
217. Cho YJ, Yi H, Chun J, Cho SN, Daley CL, Koh WJ, et al. The genome sequence of '*Mycobacterium massiliense*' strain CIP 108297 suggests the independent taxonomic status of the *Mycobacterium abscessus complex* at the subspecies level. PLoS One. 2013;8(11):e81560.
218. Heydari H, Wee WY, Lokanathan N, Hari R, Mohamed Yusoff A, Beh CY, et al. MabsBase: a *Mycobacterium abscessus* genome and annotation database. PLoS One. 2013;8(4):e62443.
219. Salipante SJ, SenGupta DJ, Cummings LA, Land TA, Hoogestraat DR, Cookson BT. Application of whole genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. J Clin Microbiol. 2015 Jan 28.
220. SenGupta DJ, Cummings LA, Hoogestraat DR, Butler-Wu SM, Shendure J, Cookson BT, et al. Whole-genome sequencing for high-resolution investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and genome plasticity. J Clin Microbiol. 2014 Aug;52(8):2787-96.
221. Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Rapidly Growing Mycobacteria. 6th edition ed. D. S, editor. Washington, D.C.: ASM Press; 2011.
222. de Moura VC, da Silva MG, Gomes KM, Coelho FS, Sampaio JL, Mello FC, et al. Phenotypic and molecular characterization of quinolone resistance in *Mycobacterium abscessus*

- subsp. bolletii* recovered from postsurgical infections. J Med Microbiol. 2012 Jan;61(Pt 1):115-25.
223. Jeon K, Kwon OJ, Lee NY, Kim BJ, Kook YH, Lee SH, et al. Antibiotic treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease: a retrospective analysis of 65 patients. Am J Respir Crit Care Med. 2009 Nov 1;180(9):896-902.
224. Oh CT, Moon C, Park OK, Kwon SH, Jang J. Novel drug combination for *Mycobacterium abscessus* disease therapy identified in a *Drosophila* infection model. J Antimicrob Chemother. 2014 Jun;69(6):1599-607.
225. Griffith DE. *Mycobacterium abscessus subsp abscessus* lung disease: 'trouble ahead, trouble behind...'. F1000Prime Rep. 2014;6:107.
226. Pang YK, Ngeow YF, Wong YL, Liam CK. *Mycobacterium abscessus* - to treat or not to treat. Respirol Case Rep. 2013 Dec;1(2):31-3.
227. Nash KA. Intrinsic macrolide resistance in *Mycobacterium smegmatis* is conferred by a novel *erm* gene, *erm*(38). Antimicrob Agents Chemother. 2003 Oct;47(10):3053-60.
228. Benwill JL, Wallace RJ, Jr. *Mycobacterium abscessus*: challenges in diagnosis and treatment. Curr Opin Infect Dis. 2014 Dec;27(6):506-10.
229. Pawlik A, Garnier G, Orgeur M, Tong P, Lohan A, Le Chevalier F, et al. Identification and characterization of the genetic changes responsible for the characteristic smooth-to-rough morphotype alterations of clinically persistent *Mycobacterium abscessus*. Mol Microbiol. 2013 Nov;90(3):612-29.
230. Martin-de-Hijas NZ, Gadea I, Garcia-Almeida D, Esteban J. Determination of the invasive capacity of nonpigmented rapidly growing mycobacteria by two different in vitro assays. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009 Dec;27(10):607-8.
231. Orme IM, Roberts AD, Furney SK, Skinner PS. Animal and cell-culture models for the study of mycobacterial infections and treatment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994 Nov;13(11):994-9.

232. Gadea I, Zapardiel J, Ruiz P, Gegundez MI, Esteban J, Soriano F. Cytopathic effect mimicking virus culture due to *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1993 Sep;31(9):2517-8.
233. Buehring GC, Valesco M, Pan CY. Cell culture contamination by mycobacteria. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1995 Nov;31(10):735-7.
234. Bermudez LE, Shelton K, Young LS. Comparison of the ability of *Mycobacterium avium*, *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* to invade and replicate within HEp-2 epithelial cells. Tuber Lung Dis. 1995 Jun;76(3):240-7.
235. Garcia-Perez BE, Hernandez-Gonzalez JC, Garcia-Nieto S, Luna-Herrera J. Internalization of a non-pathogenic mycobacteria by macropinocytosis in human alveolar epithelial A549 cells. Microb Pathog. 2008 Jul;45(1):1-6.
236. Su SH, Chen YH, Tsai TY, Huang SC, Lin CY, Chen TC, et al. Catheter-related *Mycobacterium abscessus* bacteremia manifested with skin nodules, pneumonia, and mediastinal lymphadenopathy. Kaohsiung J Med Sci. 2013 Jan;29(1):50-4.
237. Jonsson G, Rydberg J, Sturegard E, Christensson B. A case of *Mycobacterium goodii* prosthetic valve endocarditis in a non-immunocompromised patient: use of 16S rDNA analysis for rapid diagnosis. BMC Infect Dis. 2012;12:301.
238. Cornelius L, Reddix R, Burchett C, Bond G, Fader R. Cluster of *Mycobacterium fortuitum* prosthetic joint infections. J Surg Orthop Adv. 2007 Winter;16(4):196-8.
239. LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. Appl Environ Microbiol. 1988 Mar;54(3):649-54.
240. Nichols PD, Henson JM, Guckert JB, Nivens DE, White DC. Fourier transform-infrared spectroscopic methods for microbial ecology: analysis of bacteria, bacteria-polymer mixtures and biofilms. J Microbiol Methods. 1985;4:79-94.

241. Woods GL, B. A. Brown-Elliott, E. P. Desmond, G. S. Hall, L. Heifets, G. E. Pfyffer, J. C. Ridderhof, R. J. Wallace, Jr., N. G. Warren, and F. G. Witebsky. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. Document M24-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA. 2011.

9. ANEXO

RESEARCH NOTE

Polyclonality among clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria: phenotypic and genotypic differences and their potential implications

M. García-Pedrazuela¹, J. M. Frutos², M. C. Muñoz-Egea¹, F. Alcaide^{2,6}, T. Tórtola^{3,6}, A. Vitoria^{4,6}, P. Cortés⁵ and J. Esteban^{1,6}

1) Department of Microbiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, 2) Department of Microbiology, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, 3) Department of Microbiology, Hospital Vall D'Hebron, Barcelona, 4) Department of Microbiology, Hospital Clínico de Zaragoza, Zaragoza, 5) Department of Genetics and Microbiology, UAB, Bellaterra and 6) GEIM (Mycobacterial Infections Study Group), Spain

Abstract

To investigate the potential implications (especially the implications in clinical significance and antimicrobial susceptibility) of polyclonality among rapidly growing mycobacteria, we performed random amplified polymorphic DNA analysis in 64 clinical isolates of which the clinical significance was established. Phenotypic characteristics (antimicrobial susceptibility test, colony morphology and growth rate) of each clone were studied. Polyclonality was detected in 13 of the isolates (20.3%). There was a relationship between monoclonality and clinical significance ($p = 0.0096$). Monoclonal and polyclonal isolates showed different behaviour in antimicrobial susceptibility. There was a strong relationship between monoclonality and those species that are more pathogenic for humans, and also with clinical significance of the isolates.

Clinical Microbiology and Infection © 2014 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Genotypic, polyclonality, random amplified polymorphic DNA, rapidly growing mycobacteria, susceptibility

Original Submission: 22 August 2014; **Revised Submission:** 17 November 2014; **Accepted:** 6 December 2014

Editor: G. Antonelli

Article published online: XXX

Corresponding author: J. Esteban, Avda Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid, Spain
E-mail: jestebanmoreno@gmail.com

Non-pigmented rapidly growing mycobacteria are a ubiquitous group of environmental organisms that can be opportunistic pathogens [1–3]. Polyclonality has been defined as the presence of different genotypes from the same bacterial species in the same sample [4]. There are some studies suggesting that the selection of several clones can occur under stressful conditions [5], and a hypothesis explaining that different genotypes of mycobacteria could correspond with their pathogenic role [6], so the presence of polyclonality is a risk factor that needs to be researched [7].

Sixty-four clinical isolates (one isolate/patient) from six Spanish hospitals were studied. All hospitals processed the samples for mycobacterial culture using internationally standardized protocols [8]. Identification of the isolates was performed by using a PCR-hybridization method (GenoType Mycobacterium CM/AS System, Hain Lifescience, Nehren, Germany) or 16S rDNA sequencing. Up to 20 individual colonies were randomly picked from the original positive cultures and re-isolated onto Middlebrook 7H10 agar. Clinical significance of the isolates was established following international guidelines [9]. Random amplified polymorphic DNA analysis was performed by using the protocol described by Zhang *et al.* [10], using three of the described primers (INS-2, IS986-FP and OPA-2). PuRe Taq Ready-to-go PCR beads (Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, UK) were used. The amplification was conducted in a PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, St Bruno, QC, Canada) as follows: 40 cycles at 94°C for 1 min, 36°C for 1 min and at 72°C for 2 min. To avoid reproducibility problems, all colonies from the same isolate were analysed together. We compared patterns using BIOPROFIL BioGENE Software (Vilber-Lourmat, Marne la Vallée, France). Difference among clones was established when two or more high-density bands were different in at least one of the three primers used. Phenotypic studies were then performed with one strain from each clone. Minimum inhibitory concentration was studied for amikacin, cefoxitin, ciprofloxacin, clarithromycin, doxycycline and linezolid following the standardized broth microdilution test [11]. A difference between strains was considered if MIC was different in two or more dilutions. Ten microlitres of a 0.5 McFarland dilution were streaked on Middlebrook 7H10 plates and incubated at 30°C in normal atmosphere to define growth

EXPERT OPINION

1. Introduction
2. *Mycobacterium avium* complex
3. *Mycobacterium kansasii*
4. *Mycobacterium ulcerans*
5. *Mycobacterium xenopi*
6. *Mycobacterium malmoense*
7. *Mycobacterium lentiflavum*
8. *Mycobacterium simiae*
9. *Mycobacterium genavense*
10. *Mycobacterium haemophilum*
11. *Mycobacterium szulgai*
12. *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, and other nonpigmented, rapidly growing mycobacteria
13. *Mycobacterium porcinum*
14. *Mycobacterium marinum*
15. Biofilms in antimicrobial therapy
16. Conclusions
17. Expert opinion

informa
healthcare

Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update

Jaime Esteban[†], María García-Pedrazuela, María Carmen Muñoz-Egea & Fernando Alcaide

[†]Department of Clinical Microbiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

Introduction: Nontuberculous mycobacteria (NTM) are becoming increasingly important. A growing number of patients with underlying conditions that make them prone to diseases caused by NTM. These diseases include the appearance of new syndromes, such as mesotherapy and other cosmetic-related infections, or diseases that affect patients who are being treated with tumor necrosis factor.

Areas covered: A literature search has been performed for each mycobacterium species. An introduction to the different aspects of the species and the diseases is provided, along with a review of the current therapeutic options; special emphasis is put on new research and discoveries.

Expert opinion: Recognition of the current role of NTM isolates remains the key step in the management of NTM infections. After recognition, treatment must be guided by attending to the isolated species, the specific syndromes, clinical experience and – for some species – the results of in-vitro susceptibility tests. Surgical therapy is also important for some species (*Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium scrofulaceum*) and for localized infections. The treatment of uncommon species is not yet well defined and recent research on resistance mechanisms has described their importance. The role of biofilms is currently of special concern for various specific infections.

Keywords: management, mycobacteriosis, nontuberculous mycobacteria, therapy, treatment

Expert Opin. Pharmacother. (2012) 13(7):967-986

1. Introduction

In 1882, Robert Koch described the characteristics of a bacterium that was defined as the cause of tuberculosis. Many new species have been described since this discovery and, in 1986, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* recognized 54 species in the genus *Mycobacterium* [1]. To date, 150 species have been recognized and many others are awaiting classification [2]. This explosive increase in species is the result of the development of genetic tools, which have facilitated a precise bacterial taxonomy. In the last 4 years, 25 new species and 2 new subspecies have been recognized, representing 16.7% of all the described mycobacterial species (Table 1) [2]. Despite the increasing number of species, some of the characteristics described many years ago remain constant. With the exception of the type strain of the genus (*Mycobacterium tuberculosis*), the members of the *M. tuberculosis* complex (MAC) and *Mycobacterium leprae*, which are primary pathogens, all other mycobacteria are environmental organisms [3] that are opportunistic pathogens in some cases and nonpathogenic in others (Table 2) [4]. Many names have been proposed for this group of species but none has been universally accepted. This review uses the term 'nontuberculous mycobacteria' (NTM).

The importance of NTM has increased over recent decades and the pathogenic role of many of these mycobacteria has been clearly defined. Nowadays, there is

Casos de Microbiología Clínica

Caso nº 575

Infección respiratoria por *Mycobacterium abscessus*.

Descripción

Mujer de 69 años de edad, no fumadora y con antecedentes de infección respiratoria recurrente asociada a fatiga y tos crónica que acude, derivada de otro centro, al servicio de Neumología. En la radiografía de tórax se evidencia la presencia de infiltrados pulmonares múltiples bilaterales con patrón alveolo-intersticial, parcheados. Se realiza una broncoscopia en la que se hallan secreciones mucosas purulentas. Se remiten muestras para citología y microbiología (lavado bronquial y broncoalveolar).

En la citología no se evidenció ningún signo de malignidad, objetivándose células de revestimiento sin alteraciones significativas, cambios inespecíficos en macró-

fagos alveolares y leucocitos en cantidad moderada.

En la muestra de lavado bronquial crece flora bacteriana saprofita habitual. En los cultivos de micobacterias se aísla un bacilo ácido-alcohol resistente no cromógeno y de crecimiento rápido. Al tratarse de una especie potencialmente patógena se recomienda el envío de nuevas muestras. El aislamiento de este microorganismo en sucesivas ocasiones hace que se considere el agente causal de la infección. Se decide hacer un estudio de sensibilidad a varios antimicrobianos, y a la vista de los resultados se recomienda tratamiento con al menos 2 fármacos durante 12 meses. ■

1.

¿Cuál es el agente causal más probable?

Dentro del grupo de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido, *Mycobacterium abscessus* es la especie asociada más comúnmente a infecciones pulmonares crónicas. En este caso la edad avanzada, el hecho de ser mujer, no fumadora y no presentar ningún factor de riesgo asociado, junto con la presencia de

infiltrados bilaterales hacen que *M. abscessus* sea el agente causal más probable dentro de este grupo de organismos. Todo esto queda afianzado al obtenerse persistentemente múltiples cultivos positivos ya que se descarta la posible contaminación o colonización transitoria. ■

2.

¿Cuáles son las principales patologías asociadas a este microorganismo?

M. abscessus suele causar infecciones pulmonares crónicas en pacientes con bronquiectasias, fibrosis quística o patología pulmonar previa. También está presente en infecciones de piel y partes blandas destacando la infección

de herida quirúrgica, material protésico, implantes, lugares de inyección, catéteres y tatuajes así como en la formación de abscesos. En ocasiones es responsable de infecciones diseminadas en pacientes inmunodeprimidos. ■

Caso descrito y discutido por:

María García Pedrazuela, M^º
Carmen Muñoz Egea y
Jaime Esteban Moreno
Departamento de Microbiología Clínica.
IIS-Fundación Jiménez Díaz
Madrid.

Correo electrónico:
jestebanmoreno@gmail.com

CON LA COLABORACIÓN EDITORIAL DE:

Dr. JUAN IGNACIO ALÓS
Servicio de Microbiología.
Hospital Universitario de Getafe
Getafe - Madrid.

Editado por:

FRANCISCO
SORIA
MELGUIZO, S.A.

Caramuel 38, 28011 Madrid
Tel. 91 464 94 50
Fax. 91 464 62 58
<http://www.f-soria.es>

3. ¿Qué procedimientos llevarías a cabo para identificar esta especie?

El diagnóstico precoz de infección por micobacterias recae en el examen microscópico de las muestras clínicas ya que es el procedimiento más rápido, barato y simple. Sin embargo, una tinción negativa no descarta una posible infección micobacteriana subyacente, como sucede en este caso.

Ante cualquier sospecha de infección por micobacterias, además de una tinción ácido-alcohol resistente, se recomienda el cultivo de micobacterias tanto en medios líquidos como en medios sólidos. Los medios líquidos recuperan habitualmente un mayor número de mico-

bacterias con mayor rapidez que los sólidos (sistemas de detección automática).

Para una precisa y rápida identificación a nivel de especie se debe realizar una identificación genotípica (PRA, secuenciación del 16S rADN, sistemas comerciales de PCR-hibridación), ya que los resultados obtenidos con pruebas bioquímicas no permiten una adecuada caracterización de la especie, dadas las similitudes existentes entre éstas y la variabilidad de resultados que se obtienen con dichas pruebas. ■

4. ¿Cuál sería el tratamiento de elección en este caso?

Las recomendaciones actuales están basadas en series de casos no controlados y la experiencia individual. El tratamiento de *M. abscessus* en las infecciones pulmonares está limitado por la complejidad, el gasto y la toxicidad derivados de los prolongados tratamientos intravenosos que incluyen amicacina e imipenem. La enfermedad es tratable pero la curación es difícil y en muchos casos sólo se consigue evitar la progresión. El tratamiento de elección en este caso consiste en la combinación de claritromicina o amicacina junto con cefoxitina y/o tige-

ciclina e imipenem. Como fármacos alternativos vía oral podría suministrarse doxiciclina, fluoroquinolonas, azitromicina o linezolid. En todo caso, la elección de los tratamientos debe basarse en la sensibilidad *in vitro* individual de cada cepa obtenida mediante microdilución, dadas las diferencias existentes entre ellas. El tratamiento puede prolongarse hasta un año después de la negativización de los cultivos en los casos con afectación pulmonar. ■

5. ¿Por qué se recomienda administrar un tratamiento combinado?

La resistencia a fármacos debida a mutaciones producidas durante el tratamiento antibiótico aparece con los que ejercen su actividad sobre el ribosoma inhibiendo la síntesis proteica. Es el caso de los antimicrobianos claritromicina y amicacina, que son utilizados en el tratamiento de *M. abscessus*, especie que junto con *M. chelonae* única-

mente posee una copia cromosómica de ADN ribosomal (el resto de especies de micobacterias de crecimiento rápido poseen dos). Es por esto que siempre que sea posible no deben ser administrados en monoterapia a pesar de ser los más activos frente a dicho microorganismo. ■

Bibliografía

- 1 Brown-Elliott BA, Wallace RJ. Rapidly growing mycobacteria. En: David Schlossberg, editor. Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. 6ª ed. Washington, DC: ASM Press; 2013. p.565-77.
- 2 Esteban J, Garcia-Pedrazuela M, Muñoz-Egea MC, et al. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. Expert Opin Pharmacother. 2012; 13: 967-86.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Effect of ciprofloxacin in the ultrastructure and development of biofilms formed by rapidly growing mycobacteria

María-Carmen Muñoz-Egea^{1*}, María García-Pedrazuela¹, Ignacio Mahillo² and Jaime Esteban¹

Abstract

Background: The aim of this study was to analyze the effect of ciprofloxacin at different times on the development and behavior of intrinsic autofluorescence, covered area, thickness and cell viability in a biofilm formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria (NPRGM). Confocal laser scanning microscopy and image analysis were used to study the behavior of ciprofloxacin on biofilms.

Results: Thickness was the most affected parameter, although some species showed changes in other parameters. At the same time, we also measured the minimum inhibitory concentration and the minimum biofilm eradication concentration (MBEC). An increase in MBEC was observed in all the strains, *M. peregrinum* being the species that presented the highest increase.

Conclusions: This study help us to understand better how mycobacterial biofilms can be affected by ciprofloxacin.

Keywords: Mycobacteria, Biofilm, Antibiotic, Ciprofloxacin

Background

It is now considered that bacteria can have two forms during their growth and proliferation [1]: single independent cells (planktonic cells), and sessile communities of cells surrounded by an extracellular matrix (biofilms) [2]. One of the most important characteristics of biofilm-based infections is the development of a resistance to conventional antimicrobial agents, and to host defenses, that make difficult the management of these infections [3].

Several studies have demonstrated the ability of non-pigmented rapidly growing mycobacteria (NPRGM) to form biofilms [4], and their diminished susceptibility to commonly used antibiotics [5]. Although it is generally agreed that bacteria increases their resistance to antibiotics inside the biofilm, to the best of our knowledge there are no reports about the effect of antibiotics on a biofilm at different stages of development. This knowledge could be of importance, because it can allow developing new strategies for management of these diseases.

In this study, we analyze the effect of ciprofloxacin on the growth and the structure of mycobacterial biofilms during their development.

Material and methods

Mycobacterium abscessus DSM 44196, *Mycobacterium chelonae* ATCC 19235, *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841, *Mycobacterium mageritense* ATCC 700351, *Mycobacterium mucogenicum* DSM 44124, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467, and *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 were used in the experiments.

Biofilm development was analyzed at 24, 48, 72, and 96 h using hydrophobic uncoated sterile slide 2- by 4-well plates (ibidi GmbH, Martinsried, Germany), as follows. Mycobacterial colonies were resuspended in sterile phosphate buffered saline solution (PBS) (bioMérieux, France) to achieve a cell density of 1.5×10^8 CFU/ml. Three hundred microliters of this suspension was inoculated on each well. Inoculated slides were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 30 min. The suspension was then removed, and the wells were washed once with PBS. All the experiments were done in parallel with and without antibiotic. After bacterial inoculation, 300 µl of Middlebrook 7H9 broth (7H9) (BD, Estados Unidos) was added in each

* Correspondence: mcme86@gmail.com

¹Department of Clinical Microbiology, IIS- Fundación Jiménez Díaz. Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



Figura 1. Lesión vegetante blanquecina en la lengua.

en el análisis histológico una proliferación de células escamosas, epidermis papilomatosa con paraqueratosis y ligera atipia celular. La tinción inmunohistoquímica resultó positiva para el VPH, lo que confirmaba nuestra sospecha inicial. Se le realizó una analítica de sangre general, que no mostró ningún dato de interés, y una serología para VIH, que resultó negativa. El paciente fue sometido a cirugía láser de dióxido de carbono, sin que mostrara signos de recurrencia tras 3 años de seguimiento.

La POF es una rara afectación de la cavidad oral y labios que consiste en la formación de múltiples crecimientos verruciformes y papilomatosos que confluyen formando placas y vegetaciones¹. Se presenta más frecuentemente en varones de entre 60 y 70 años. El tabaco se muestra como el factor de mayor importancia, y algunos estudios han demostrado que la costumbre de fumar tabaco importante de alcohol, la mala higiene bucal, los traumatismos o irritantes crónicos y/o las situaciones de inmunosupresión también se han

visto implicadas en su etiología³. Es considerada como una variante de bajo grado de malignidad del carcinoma verrucoso de mucosa oral, y los serotipos detectados han sido el 6, el 11 y el 16 del VPH¹. En ocasiones se desarrollan focos de carcinoma escamoso⁴, lo que hace necesario una vigilancia estrecha y un tratamiento orientado a la resolución completa⁵.

Con este caso se demuestra el amplio rango clínico de afectación infecciosa cutáneo-mucosa provocada por el VPH y los diferentes serotipos implicados.

Por tanto, las infecciones por el VPH, frecuentemente confundidas con infecciones fúngicas, deberían ser tenidas en mayor consideración, sobre todo por el claro potencial de transformación maligna que presentan.

Bibliografía

1. Eversole LR. Papillary lesions of the oral cavity: Relationship to human papillomavirus. J Calif Dent Assoc. 2000;28:922-7.
2. Schwartz RA. Verrucous carcinoma of the skin and mucosa. J Am Acad Dermatol. 1995;32:1-21.
3. Grillo E, Miguel-Morondo A, Vano-Galván S, Jaén-Olasolo P. Oral florid papillomatosis. Rev Clin Esp. 2012;212:93.
4. Wenzel K, Saka B, Zimmermann R, Gundlach KK, Barten M, Gross G. Malignant conversion of florid oral and labial papillomatosis during topical immunotherapy with imiquimod. Med Microbiol Immunol. 2003;192:161-4.
5. Yoshimura Y, Mishima K, Obara S, Narai Y, Yoshimura H, Mikami T. Treatment modalities for oral verrucous carcinomas and their outcomes: Contribution of radiotherapy and chemotherapy. Int J Clin Oncol. 2001;6: 192-200.

Luis Miguel Pérez-Belmonte^{a,*}, Elisabeth Gómez-Moyano^b, Leticia Herrero-Lifona^c y Francisco Jiménez-Oñate^d

^a Servicio de Medicina Interna, Hospital Comarcal de La Axarquía, Vélez-Málaga, Málaga, España

^b Servicio de Dermatología, Hospital Universitario Carlos Haya, Málaga, España

^c Servicio de Alergología, Hospital Universitario Carlos Haya, Málaga, España

^d Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Carlos Haya, Málaga, España

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: luismiguelpb@hotmail.com (L.M. Pérez-Belmonte).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.04.011>

Sensibilidad in vitro de biopelículas de micobacterias de crecimiento rápido frente a diferentes antimicrobianos

In vitro susceptibility of rapidly growing mycobacteria biofilms against different antimicrobials

Sr. Editor:

Las enfermedades causadas por micobacterias atípicas o no tuberculosas, y especialmente por micobacterias de crecimiento rápido (MCR), son un fenómeno cada vez más extendido en todo el mundo^{1,2}. De entre los muchos factores que inciden en el aumento de casos comunicados se incluyen la ubicuidad de dichos microorganismos en el medio ambiente y la capacidad de los mismos para formar biopelículas^{3,4}. Dicha característica les hace ser especialmente resistentes a antibióticos comúnmente utilizados para tratar infecciones micobacterianas en la práctica clínica actual (como son,

por ejemplo, amikacina, ciprofloxacino o claritromicina)⁵. Algunos estudios estiman que la resistencia a antibióticos de las bacterias que se encuentran formando parte de una biopelícula es unas 1.000-1.500 veces mayor en comparación con las células planctónicas⁶, aunque hay pocos estudios relacionados con dicha resistencia en biopelículas formadas por MCR^{5,7,8}.

El objetivo de este estudio es determinar la influencia de la formación de biopelículas por MCR en la sensibilidad frente a distintos antimicrobianos mediante un sistema estandarizado. Para ello, se estudiaron las cepas tipo *Mycobacterium abscessus* DSM 44196, *Mycobacterium chelonae* ATCC 19235, *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841, *Mycobacterium mageritense* ATCC 700351, *Mycobacterium mucogenicum* DSM 44124, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467 y *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607. Los antibióticos estudiados fueron amikacina (AN), claritromicina (CLR) y ciprofloxacino (CIP) (Sigma, Alemania). Se estableció la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas estudiadas mediante la técnica de microdilución en caldo para MCR de acuerdo con el protocolo

Autofluorescence as a Tool for Structural Analysis of Biofilms Formed by Nonpigmented Rapidly Growing Mycobacteria

María-Carmen Muñoz-Egea, María García-Pedrazuela, Ignacio Mahillo, María Jesús García and Jaime Esteban
Appl. Environ. Microbiol. 2013, 79(3):1065. DOI: 10.1128/AEM.03149-12.
Published Ahead of Print 30 November 2012.

Updated information and services can be found at:
<http://aem.asm.org/content/79/3/1065>

SUPPLEMENTAL MATERIAL	<i>These include:</i>
	Supplemental material
REFERENCES	This article cites 17 articles, 7 of which can be accessed free at: http://aem.asm.org/content/79/3/1065#ref-list-1
CONTENT ALERTS	Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), more»

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Autofluorescence as a Tool for Structural Analysis of Biofilms Formed by Nonpigmented Rapidly Growing Mycobacteria

María-Carmen Muñoz-Egea,^a María García-Pedrazuela,^a Ignacio Mahillo,^b María Jesús García,^c Jaime Esteban^a

Departments of Clinical Microbiology^a and Epidemiology,^b IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; Department of Preventive Medicine, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma, Madrid, Spain^c

The structure of biofilms formed by seven nonpigmented rapidly growing mycobacteria, including saprophytes and opportunistic species, was analyzed. Analysis included amount of covered surface, thickness, cell viability, and presence of intrinsic autofluorescence at different times using confocal laser scanning microscopy and image analysis. Autofluorescence was detected inside and outside cells of all mycobacteria.

It is known that bacteria grow in nature by forming structured and specialized communities of organisms embedded in a matrix of extrapolymeric substance known as a biofilm (1). Biofilms are also considered to be an important pathogenic factor for many diseases, especially implant-related infections (2).

Nonpigmented rapidly growing mycobacteria (NPRGM) (3) are usually considered contaminants or colonizers, although in some patients they are the true cause of the disease (4, 5). The source of human infection is usually the environment (6), with drinking water distribution systems and hospital and household plumbing being the mainly reported sources (4, 7). Findings of recent studies suggest that the biofilm-developing capacity is a property related to the involvement of these bacteria in human pathogenicity (8) and in antimicrobial resistance (9, 10). In a previous report, we observed that NPRGM were able to form biofilms *in vitro* (5), with differences regarding the importance of biofilms in the pathogenesis of human diseases (11). Other studies have also shown differences among strains within the same species (12). Moreover, there are studies that relate the ability to form biofilms with the presence of cording or rough colonies in the tested strains (12–14).

Intrinsic autofluorescence, including the presence of autofluorescence in the cyan range in *Mycobacterium* species (16), is a characteristic that has been found previously in several microorganisms (15). In this study, we aimed to analyze the structure of mycobacterial biofilms, with a special focus on detection of autofluorescence.

The strains used were *Mycobacterium abscessus* DSM 44196, *Mycobacterium chelonae* ATCC 19235, *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841, *Mycobacterium mageritense* ATCC 700351, *Mycobacterium mucogenicum* DSM 44124, *Mycobacterium peregrinum* ATCC 14467, and *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607.

Biofilm development was analyzed at 24, 48, 72, and 96 h using hydrophobic uncoated sterile slide 2- by 4-well plates (ibidi GmbH, Martinsried, Germany), as follows.

Mycobacterial colonies were resuspended in sterile phosphate-buffered saline solution (PBS) to achieve a cell density of 1.5×10^8 CFU/ml. Three hundred microliters of this suspension was inoculated on each well. Inoculated slides were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 30 min. The suspension was then removed, and the wells were washed once with PBS. Three hundred microliters of Middlebrook 7H9 broth was then added to each well, and the slides were placed on an orbital shaker (80 rpm) and

incubated at 37°C in normal atmosphere for 4 days. Slides were examined, and the medium was changed daily. All the experiments were performed in triplicate for each strain.

The slide wells were stained using Live/Dead BackLight stain (Invitrogen, Eugene, OR) and Nile Red stain (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Stains were performed according to the instructions provided by the manufacturer. More specifically, Live/Dead BackLight staining was carried out as follows. A working solution was prepared using the L7012 kit reagents. Three microliters of component A and 3 µl of component B were mixed with 1 ml of sterile distilled water. The solution was mixed thoroughly, and 25 µl of working solution was added to each well, followed by incubation for 15 min in the dark, and then the stain was removed and the well was washed with sterile distilled water. After staining, plates were analyzed using a Leica DM IRB confocal laser-scanning microscope (Leica, Germany).

One set of wells was used per NPRGM species to study both autofluorescence and Nile Red stain, and the other was used to analyze the proportion of live and dead mycobacteria. All materials managed in the experiments emitted no autofluorescence.

The covered surface was studied by taking 24 microphotographs for each stain, bacterium, and time set. Photographs were analyzed as previously described (5). The thickness of the biofilm was measured in eight predefined points/well.

Linear mixed-effects models were used to evaluate the effect of testing time and species on autofluorescence. This variable was analyzed as the percentage of fluorescence related to the number of bacterial cells detected with the Nile Red stain using the following formulation: (% autofluorescence of covered surface/% Nile Red covered surface) \times 100. Time was treated as a continuous variable, and species was treated as a nominal factor. For interspecies comparisons, *M. abscessus* was taken as a reference category. Fitted models included fixed effects for species and time, random

Received 11 October 2012 Accepted 28 November 2012

Published ahead of print 30 November 2012

Address correspondence to Jaime Esteban, jestedbanmoreno@gmail.com.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03149-12>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.03149-12